

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: **0 295 156 B1**

(12)

## FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

- (45) Date de publication de fascicule du brevet: **26.04.95** (51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C12N 15/32, C12N 1/21, C12P 21/02, A01N 63/00, A01H 5/00**
- (21) Numéro de dépôt: **88401121.4**
- (22) Date de dépôt: **06.05.88**

- (54) Séquences de nucléotides codant pour des polypeptides dotés d'une activité larvicide vis-à-vis de lépidoptères.

- (30) Priorité: **10.06.87 FR 8708090**
- (43) Date de publication de la demande: **14.12.88 Bulletin 88/50**
- (45) Mention de la délivrance du brevet: **26.04.95 Bulletin 95/17**
- (84) Etats contractants désignés:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**
- (56) Documents cités:  
**EP-A- 0 178 151**  
**EP-A- 0 192 319**  
**EP-A- 0 224 331**  
**EP-A- 0 228 838**

- (73) Titulaire: **INSTITUT PASTEUR**  
**28, rue du Docteur Roux**  
**F-75724 Paris Cédex 15 (FR)**

Titulaire: **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**15, quai Anatole France**  
**F-75007 Paris (FR)**

Titulaire: **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE**  
**145, rue de l'Université**  
**F-75341 Paris Cédex 07 (FR)**

- (72) Inventeur: **Sanchis, Vincent**  
**15 avenue Toulouse Lautrec**  
**F-78390 Bois d'Arcy (FR)**  
Inventeur: **Lereclus, Didier**  
**16 bis rue Lauriston**  
**F-75116 Paris (FR)**  
Inventeur: **Menou, Ghislaine**  
**22 rue Rosenwald**  
**F-75015 Paris (FR)**

Il est rappelé que: Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen, toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition (art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

## Description

L'invention a pour objet des séquences de nucléotides codant pour des polypeptides dotés d'une activité larvicide vis-à-vis de lépidoptères.

5 Elle vise plus spécialement des moyens, en particulier des séquences nucléotidiques, des polypeptides ou encore des vecteurs, ou des souches bactériennes, modifiés par ces séquences et exprimant des polypeptides permettant de préparer des compositions larvicides actives vis-à-vis de lépidoptères, de préférence vis-à-vis de *Spodoptera littoralis* (ci-après *S.littoralis*) ou *Mamestra brassicae* (ci-après désignée par *M.brassicae*) ou capables de transformer les plantes à traiter en leur conférant ce type d'activité.

10 On sait que la plupart des isolats de *B.thuringiensis* présentent une activité toxique à l'égard de larves de plus de cent espèces de lépidoptères.

Cette activité résulte, de la capacité des souches de *B.thuringiensis* à synthétiser, au moment de la sporulation, des inclusions cristallines de nature protéique, ou  $\delta$ -endotoxines, sous le contrôle d'un ou plusieurs types de gènes.

15 On a montré que l'activité de ces polypeptides est contenue dans la moitié NH<sub>2</sub>-terminale ou N-terminale de la protéine.

Les travaux réalisés ont montré la spécificité élevée des  $\delta$ -endotoxines vis-à-vis de larves d'une espèce donnée.

20 En raison de cette spécificité élevée, de nombreuses espèces de lépidoptères, notamment de la famille des Noctuelles, ne réagissent que faiblement aux préparations commerciales de *B.thuringiensis* disponibles.

Il en est ainsi en particulier de l'espèce *S.littoralis*, insecte polyphage qui constitue le principal parasite du coton et d'autres cultures industriellement importantes. Parmi ces cultures, on citera le maïs, le ricin, le tabac, l'arachide, des plantes fourragères, telles que le trèfle ou la luzerne, ou encore des produits maraîchers comme le chou ou la tomate.

25 On conçoit donc l'intérêt de disposer de moyens ciblant spécifiquement et efficacement la famille des Noctuelles et notamment *S.littoralis* ou *M.brassicae*.

Les gènes de  $\delta$ -endotoxines identifiés à ce jour, ne codent pas pour un polypeptide actif préférentiellement à l'égard de *S.littoralis*.

30 Dans une publication dans "Molecular Biology of Microbial Differentiation" p.217-222, Sept. 1984, Klier et al. ont décrit l'expression dans *E.coli* d'un fragment BamHI de 13 kb d'un gène d'une protéine du crystal de *B.thuringiensis aizawai* 7.29. Ce fragment d'ADN exprime un polypeptide d'environ 130 kDa.

La recherche par les inventeurs d'une séquence de nucléotides codant pour un polypeptide actif de préférence vis-à-vis des Noctuelles, plus spécialement vis-à-vis de *S.littoralis*, les a conduits à étudier les isolats naturels de deux souches de *B.thuringiensis* dont l'activité larvicide sur *S.littoralis* apparaît plus élevée que celle des préparations industrielles faites à partir d'autres souches de *B.thuringiensis*.

35 Il s'agit des souches *aizawai* 7-29 et *entomocidus* 6-01.

L'étude de ces isolats a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs gènes de  $\delta$ -endotoxines de structures différentes et de spécificités différentes, dont deux gènes préférentiellement actifs contre *P.brassicae* mais peu actifs vis-à-vis de la Noctuelle du coton et un gène inactif vis-à-vis de *P.brassicae* et de *S.littoralis*.

40 En étudiant l'ADN total de ces isolats et en effectuant des hybridations appropriées, suivies du clonage des fragments identifiés par hybridation, les inventeurs ont constaté qu'il est possible d'isoler des séquences nucléotidiques impliquées dans des gènes de  $\delta$ -endotoxines codant pour des polypeptides actifs, de préférence contre *S.littoralis*.

45 L'invention a donc pour but de fournir des séquences nucléotidiques capables de coder pour au moins la partie NH<sub>2</sub>-terminale d'une  $\delta$ -endotoxine toxique contre les Noctuelles, de préférence contre *S.littoralis* ou *M.brassicae*.

Elle a également pour but de fournir un polypeptide toxique à l'égard des Noctuelles.

50 L'invention vise en outre un procédé d'obtention d'une telle séquence et d'un polypeptide présentant l'activité recherchée ainsi que les moyens intermédiaires tels que vecteurs et souches bactériennes utilisables pour l'obtention du polypeptide.

L'invention vise de plus les applications de ces séquences et polypeptides pour l'élaboration de compositions larvicides l'égard des Noctuelles, en particulier de *S.littoralis* et pour la transformation des plantes susceptibles d'être infectées par ces larves.

55 L'invention concerne une séquence de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de façon spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de *S.littoralis*, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de *S.littoralis*.

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence nucléotidique est caractérisée en ce qu'elle est portée par une séquence de nucléotides d'environ 3kb telle qu'obtenue par recombinaison génétique *in vitro* de séquences de nucléotides de *B.thuringiensis* capables de s'hybrider avec des sondes 1, 2 et 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2. Le fragment de 3kb correspond plus spécialement au fragment de restriction

5 HindIII-PstI.

Les séquences de nucléotides de l'invention sont, en outre, caractérisées en ce qu'elles comportent des sites dans l'ordre suivant : HindIII - HincII - BglII KpnI - HindIII - PstI.

De manière préférée, ces séquences de nucléotides sont obtenues par recombinaison génétique *in vitro* de séquences d'ADN provenant d'au moins une souche de *B.thuringiensis*. Dans une variante de réalisation

10 de l'invention, deux souches différentes de *B.thuringiensis* sont mises en oeuvre.

Des souches de *B.thuringiensis* particulièrement appropriées pour l'obtention de ces séquences de nucléotides sont les souches correspondant à aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, déposées le 21 Avril 1987 respectivement sous les n° 1-661 et n° 1-660 à la Collection nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) à Paris.

15 D'une manière avantageuse, les séquences de nucléotides de l'invention codent pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides présentant l'activité larvicide à l'égard de *S.littoralis*.

Une séquence de nucléotides selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant :

20

```

      52
GTC TAC TTG ACA GGG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT CGG GCA TAT ATT CAT
      112
ATT TTA TAA AAT TTC TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA AGA TGT GTC ATA TGT ATT AAA
      172
25 TCG TCG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA ATA AAA AAA CCG
      232

AGG TAT TTT ATG CAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT
      292

CCT GAA GAA GTA CTT TTG GAT GGA GAA CGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT
30      352
TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GGG GGA GGA TTT TTA GTT
      412

GGA TTA ATA GAT TTT GTA TGG GGA ATA GTT GGC CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA GTA
35      472

CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT AGG AAT GCT GCT ATT GCT
      532

AAT TTA GAA GGA TTA GGA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TGG CAA
      592
40 GAA CAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CGG TTT CGT ATA CTT CAT
      652

GGG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA
      712
45 TCC GTT TAT GCT CAA GCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA ATT TTT
      772

GGA GAA AGA TGG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT AGG
      832

CAT ATT GAT GAA TAT GCT GAT CAC TGT CCA AAT ACG TAT AAT CGG GGA TTA AAT AAT TTA
50      892

CCG AAA TCT ACG TAT CAA GAT TGG ATA ACA TAT AAT CGA TTA CGG ACA GAC TTA ACA TTG
      952

ACT GTA TTA CAT ATC CCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC

```

55

Des séquences de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles.

de préférence vis-à-vis de S.littoralis sont caractérisées en ce qu'elles comprennent l'enchaînement (I) défini ci-dessus.

D'une manière avantageuse, la séquence de nucléotides caractérisée par l'enchaînement défini ci-dessus code pour une partie d'un polypeptide ayant une activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis plus élevée que celle des polypeptides codés par des isolats naturels actuellement connus pour leurs effets vis-à-vis de S.littoralis.

L'étude de cette séquence de nucléotides montre qu'elle est caractérisée par un codon d'initiation ATG situé en position 241 à partir duquel une phase ouverte de lecture de 750 nucléotides a été identifiée.

Cette séquence est également caractérisée par un site d'attachement des ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

Selon un autre aspect, la séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comporte, en amont du codon ATG, une séquence allant du nucléotide en position 137 au nucléotide en position 177, fortement homologue à la région trouvée par Wong et al. (1983) et décrit dans (16) en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) et dont les auteurs ont montré qu'elle contenait trois promoteurs Btl, BtlI et Ec qui sont respectivement fonctionnels chez B.thuringiensis et E.coli. L'homologie de ces séquences est d'environ 70%.

L'invention concerne également une séquence de nucléotides codant pour la séquence (II) d'acides aminés suivante :

20

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN

PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE

25

SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL

GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL

30

GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA

ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU

35

GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP

GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU

40

SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE

GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG

HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU

45

PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU

THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

50

Une meilleure identification de la séquence de nucléotides isolée des souches ci-dessus, déposées à la CNCM a permis de constater que le nucléotide situé en position 273 est la guanine (G), l'acide aminé résultant du codon GTA étant alors la valine.

Or, la lecture du nucléotide correspondant à cette position 273 dans la demande FR.8708090 du 10 juin 1987 avait conduit à mentionner la thymine (T) et, comme acide aminé résultant du codon TTA, la leucine.

Une autre séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée par sa capacité d'hybridation avec une sonde formée à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement suivant :

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70  
 71  
 72  
 73  
 74  
 75  
 76  
 77  
 78  
 79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100  
 101  
 102  
 103  
 104  
 105  
 106  
 107  
 108  
 109  
 110  
 111  
 112  
 113  
 114  
 115  
 116  
 117  
 118  
 119  
 120  
 121  
 122  
 123  
 124  
 125  
 126  
 127  
 128  
 129  
 130  
 131  
 132  
 133  
 134  
 135  
 136  
 137  
 138  
 139  
 140  
 141  
 142  
 143  
 144  
 145  
 146  
 147  
 148  
 149  
 150  
 151  
 152  
 153  
 154  
 155  
 156  
 157  
 158  
 159  
 160  
 161  
 162  
 163  
 164  
 165  
 166  
 167  
 168  
 169  
 170  
 171  
 172  
 173  
 174  
 175  
 176  
 177  
 178  
 179  
 180  
 181  
 182  
 183  
 184  
 185  
 186  
 187  
 188  
 189  
 190  
 191  
 192  
 193  
 194  
 195  
 196  
 197  
 198  
 199  
 200  
 201  
 202  
 203  
 204  
 205  
 206  
 207  
 208  
 209  
 210  
 211  
 212  
 213  
 214  
 215  
 216  
 217  
 218  
 219  
 220  
 221  
 222  
 223  
 224  
 225  
 226  
 227  
 228  
 229  
 230  
 231  
 232  
 233  
 234  
 235  
 236  
 237  
 238  
 239  
 240  
 241  
 242  
 243  
 244  
 245  
 246  
 247  
 248  
 249  
 250  
 251  
 252  
 253  
 254  
 255  
 256  
 257  
 258  
 259  
 260  
 261  
 262  
 263  
 264  
 265  
 266  
 267  
 268  
 269  
 270  
 271  
 272  
 273  
 274  
 275  
 276  
 277  
 278  
 279  
 280  
 281  
 282  
 283  
 284  
 285  
 286  
 287  
 288  
 289  
 290  
 291  
 292  
 293  
 294  
 295  
 296  
 297  
 298  
 299  
 300  
 301  
 302  
 303  
 304  
 305  
 306  
 307  
 308  
 309  
 310  
 311  
 312  
 313  
 314  
 315  
 316  
 317  
 318  
 319  
 320  
 321  
 322  
 323  
 324  
 325  
 326  
 327  
 328  
 329  
 330  
 331  
 332  
 333  
 334  
 335  
 336  
 337  
 338  
 339  
 340  
 341  
 342  
 343  
 344  
 345  
 346  
 347  
 348  
 349  
 350  
 351  
 352  
 353  
 354  
 355  
 356  
 357  
 358  
 359  
 360  
 361  
 362  
 363  
 364  
 365  
 366  
 367  
 368  
 369  
 370  
 371  
 372  
 373  
 374  
 375  
 376  
 377  
 378  
 379  
 380  
 381  
 382  
 383  
 384  
 385  
 386  
 387  
 388  
 389  
 390  
 391  
 392  
 393  
 394  
 395  
 396  
 397  
 398  
 399  
 400  
 401  
 402  
 403  
 404  
 405  
 406  
 407  
 408  
 409  
 410  
 411  
 412  
 413  
 414  
 415  
 416  
 417  
 418  
 419  
 420  
 421  
 422  
 423  
 424  
 425  
 426  
 427  
 428  
 429  
 430  
 431  
 432  
 433  
 434  
 435  
 436  
 437  
 438  
 439  
 440  
 441  
 442  
 443  
 444  
 445  
 446  
 447  
 448  
 449  
 450  
 451  
 452  
 453  
 454  
 455  
 456  
 457  
 458  
 459  
 460  
 461  
 462  
 463  
 464  
 465  
 466  
 467  
 468  
 469  
 470  
 471  
 472  
 473  
 474  
 475  
 476  
 477  
 478  
 479  
 480  
 481  
 482  
 483  
 484  
 485  
 486  
 487  
 488  
 489  
 490  
 491  
 492  
 493  
 494  
 495  
 496  
 497  
 498  
 499  
 500  
 501  
 502  
 503  
 504  
 505  
 506  
 507  
 508  
 509  
 510  
 511  
 512  
 513  
 514  
 515  
 516  
 517  
 518  
 519  
 520  
 521  
 522  
 523  
 524  
 525

931  
 1081  
 1171  
 1261  
 1351  
 1441  
 1531  
 1621  
 1711  
 1801

1641  
 1901  
 2071  
 2181  
 2251  
 2341  
 2431  
 2521  
 2611  
 2701  
 161 1CC 16C AG

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

1641  
 1901  
 2071  
 2181  
 2251  
 2341  
 2431  
 2521  
 2611  
 2701  
 161 1CC 16C AG

55 De façon particulière, des séquences de nucléotides de l'invention codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de *S.littoralis* comprennent ou sont constituées par l'enchaînement (III) défini précédemment.

L'enchaînement (III), compris dans la séquence de nucléotides de l'invention, contient 2711 nucléotides. Ce fragment comprend notamment le promoteur potentiel du gène de la  $\delta$ -endotoxine active sur *S.littoralis*.

Entrent naturellement dans le cadre de la présente invention, des séquences de nucléotides modifiées par rapport aux enchaînements (I) ou (III) décrits ci-dessus, dans la mesure où ces modifications ne génèrent pas des variations sensibles de la toxicité du polypeptide codé par la séquence modifiée, vis-à-vis de *S.littoralis*.

5 Ces modifications peuvent par exemple consister en des délétions, substitutions, recombinaisons.

Ainsi les séquences de nucléotides (I) et (III) comportent en leur position 611 un nucléotide variable correspondant l'adénine (A) dans la séquence (I) et à la cytosine (C) dans la séquence (III). Ces nucléotides entrent dans la composition des codons respectifs GAA et GCA qui codent respectivement pour les acides aminés acide glutamique (GLU) et alanine (ALA) dans les séquences respectives II et IV.

10 De même toute séquence de nucléotides hybridable avec celle des enchaînements (I) ou (III), telle qu'obtenue par transformation enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique entre également dans le cadre des définitions de l'invention.

La séquence de nucléotides de formule (III) commence par un codon d'initiation ATG situé en position 241 et qui représente le début d'une phase ouverte de lecture de 2470 nucléotides.

15 L'invention concerne en outre une séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV) d'acides aminés ci-après :

20

25

30

35

40

45

50

55



5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

271 MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE  
 PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER ILE ASP ILE SER LEU SER  
 281 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER  
 431 GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU  
 541 LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE  
 631 ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR  
 721 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU  
 811 CYS TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER  
 901 THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

991

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER  
 1081 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE  
 1171 THR ASP TRP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TRP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ASN ILE THR SER PRO  
 1261 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG  
 1331 LEU LEU GLN PRO CYS GLN ARG HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU VAL GLU PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYR  
 1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS  
 1531 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL VAL PHE SER TRP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN  
 1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TRP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE  
 1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG  
 1801 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

114  
 1901  
 2071  
 2101  
 2201  
 2341  
 2431  
 2521  
 2611  
 2701

ARG MET PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR SER ARG THR ARG TYR THR ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE  
 ARG ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE  
 LEU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA GLN LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN  
 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP  
 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE  
 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU  
 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG  
 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER  
 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP  
 CYS SER CYS

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage comportant plus particulièrement au moins une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, en particulier au moins une partie de la séquence d'environ 3kb.

Un vecteur recombinant particulier est par exemple un plasmide comprenant le fragment HindIII-PstI de la séquence de nucléotides de l'invention, inséré dans un vecteur pUC9. Un premier vecteur préféré est le plasmide pHT71 dont la construction est rapportée dans les ensembles ci-après, qui comprend un fragment

d'ADN HindIII-PstI selon l'invention constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29.

Un autre vecteur recombinant est constitué par le plasmide pHT 671 dont la construction est donnée dans la figure 4. Ce plasmide comprend un fragment HindIII-PstI chimère, obtenu en fusionnant un fragment d'ADN HindIII-HincII de 1,1 kb provenant de la souche entomocidus 6-01 avec un fragment HincII-PstI de 1,9 kb issu de la souche aizawai 7-29.

Entrent également dans le cadre de l'invention les souches bactériennes modifiées qui comportent l'une des séquences nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant d'expression et de clonage défini précédemment, de préférence le plasmide pHT 671 ou le plasmide pHT71.

L'invention vise en outre un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, s'attaquant aux feuilles de coton ou des autres cultures telles qu'énumérées ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

L'invention vise plus particulièrement la partie NH<sub>2</sub>-terminale de ce polypeptide qui renferme l'activité larvicide.

L'extrémité de la partie NH<sub>2</sub>-terminale active répond à la séquence (II) d'acides aminés donnée ci-dessus.

Un polypeptide préféré de l'invention est celui qui répond à cette séquence (II) et répond à la séquence (IV) d'acides aminés donnée dans les pages précédentes. Ce polypeptide répondant à la séquence (IV) comprend 823 acides aminés. Sa masse moléculaire calculée est de 92906 Da.

Cette séquence de  $\delta$ -endotoxine a été comparée aux séquences en acides aminés des  $\delta$ -endotoxines provenant d'autres souches de B.thuringiensis actives sur les lépidoptères et dont les gènes ont été isolés et séquencés précédemment : il s'agit des  $\delta$ -endotoxines des souches kurstaki HD1 (19), kurstaki HD73 (20), berliner 1715 (21) et (22) Sotto (23) et aizawai IPL7 (24).

Les résultats de ces comparaisons indiquent que toutes sont différentes dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620) alors que la partie NH<sub>2</sub> terminale (acides aminés 1 à 280) et le domaine COOH terminal (acides aminés 621 à 1175) de la protéine sont très conservés et ne diffèrent que par quelques acides aminés. En revanche la  $\delta$ -endotoxine correspondant à la séquence (IV) ci-dessus présente des différences importantes avec les autres  $\delta$ -endotoxines, aussi bien dans la partie NH<sub>2</sub> terminale (acides aminés 1 à 280) que dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620). Les résultats de ces comparaisons indiquent encore que la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule (acides aminés 1 à 620) qui correspond à la fraction toxique de la protéine ne présente que 46% d'homologie avec les autres  $\delta$ -endotoxines. Les différences les plus importantes se situent dans la seconde moitié de la partie toxique de la molécule (acides aminés 281 à 620) avec seulement 36% d'acides aminés identiques, la partie NH<sub>2</sub>-terminale (acides aminés 1 à 280) présentant quant à elle 58% d'acides aminés identiques avec les autres  $\delta$ -endotoxines. De telles différences importantes n'ont jamais été observées jusqu'à présent dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la fraction toxique de la molécule, parmi les  $\delta$ -endotoxines actives sur les lépidoptères.

Pour obtenir une séquence de nucléotides entrant dans le cadre de l'invention, codant pour au moins la partie active d'un polypeptide présentant une toxicité spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, on a recours, conformément à l'invention, aux étapes suivantes, à savoir :

- la réalisation d'une hybridation moléculaire entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis active contre S.littoralis, et d'autre part au moins deux séquences de nucléotides, utilisées comme sondes, provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène de  $\delta$ -endotoxine de B.thuringiensis, cette partie codant pour la partie NH<sub>2</sub>-terminale du polypeptide actif sur les larves de lépidoptères et de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du polypeptide,
- l'isolement du fragment hybridé,
- son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

De manière avantageuse, les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène de  $\delta$ -endotoxine provenant de la souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de 130 kDa, active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

Dans un mode de réalisation du procédé précédent, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant d'une unique souche de B.thuringiensis, de préférence aizawai 7-29. En particulier ce fragment est porté préférentiellement par le plasmide recombinant pHTA6 tel qu'isolé à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotides issues de souches

B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins deux souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif, de manière préférentielle, vis-à-vis de S.littoralis.

Dans ce cas, le fragment recombiné utilisé dans l'étape de clonage est un fragment de 3kb environ, élaboré avantageusement à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII d'environ 1.1kb provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment HincII-PstI d'environ 1.9kb de la souche aizawai 7-29. Il correspond à un gène tronqué de  $\delta$ -endotoxine.

Les fragments de restriction HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés plus spécialement par les plasmides recombinants respectifs pHT6 et pHTA6 tels qu'isolés à l'aide de la sonde constituée par le fragment PvuII dont question ci-dessus.

L'étude de la toxicité, vis-à-vis des larves de lépidoptères, des souches bactériennes modifiées à l'aide des séquences de nucléotides définies ci-dessus, a permis de mettre en évidence leur activité toxique élevée, notamment à l'égard des chenilles de S.littoralis.

Cette activité a été appréciée au regard de l'indice de spécificité correspondant au rapport

## CL50 S.littoralis

## CL50 P.brassicae

dans lequel "CL50" représente la concentration létale tuant 50% des larves en 72 heures.

L'utilisation d'un tel indice permet d'évaluer l'activité des souches bactériennes étudiées sans avoir à considérer le taux d'expression des polypeptides.

Les résultats obtenus, qui sont rapportés dans les exemples qui suivent, et les valeurs de DL 50 qui en sont déduites, ont montré que les souches bactériennes modifiées selon l'invention présentent une activité toxique vis-à-vis de S.littoralis plus spécifique que les protéines de cristal natives des souches azawai 7-29 ou berliner 1715.

L'invention vise donc l'application, pour l'élaboration de compositions larvicides toxiques de préférence vis-à-vis de S.littoralis, de ces souches modifiées, de vecteurs recombinants renfermant les séquences nucléotidiques définies plus haut, en particulier du plasmide pHT671 et du plasmide pHT71, et de ces séquences elles-mêmes.

Les compositions larvicides de l'invention sont alors caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace de polypeptides tels que définis ci-dessus ou exprimés par les séquences nucléotidiques évoquées plus haut.

pour produire ces polypeptides on met avantageusement en oeuvre les gènes tronqués de  $\delta$ -endotoxine correspondant aux séquences nucléotidiques de l'invention.

Ces gènes peuvent être utilisés pour produire en excès le polypeptide toxique dans des microorganismes permettant l'expression des vecteurs recombinants ci-dessus. Des souches de microorganismes appropriées comprennent E.coli ou encore B.subtilis.

Ces gènes tronqués peuvent être réintroduits dans les souches de B.thuringiensis ou dans des espèces apparentées telle que B.cereus, selon les techniques classiques, par exemple, par transformation, conjugaison ou transduction. Ces techniques permettent de produire le polypeptide toxique en grande quantité sans avoir à modifier au préalable la région naturelle du promoteur des gènes de  $\delta$ -endotoxine de B.thuringiensis.

Cette transformation peut être effectuée en utilisant des méthodes dérivées de la transformation des protoplastes de B.subtilis selon (11) ou des cellules végétatives de B.thuringiensis comme décrit dans (12).

L'introduction de plasmides recombinants par un système de type conjugaison, peut être réalisée en utilisant B.thuringiensis comme souche hôte et B.subtilis ou Streptococcus faecalis comme souches de type donneur, en opérant selon (13) et (14).

En variante, les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences. L'introduction peut être effectuée dans des microorganismes tels que Pseudomonas en opérant selon le procédé décrit dans (17), par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques contenant le transposon Tn5 et le gène de la toxine, ou Azospirillum ou Rhizobium par l'intermédiaire de vecteurs suicides dérivés du plasmide RP4 et de plasmides mobilisateurs fonctionnels chez les bactéries gram

négatives (pRK2013 par exemple) selon les procédés décrits dans (18).

Les gènes tronqués sont seuls dans les souches de Bacilli, ou en variante sont associés à différents gènes de  $\delta$ -endotoxine ce qui permet d'obtenir des cristaux synthétisés par ces souches spécifiquement toxiques, vis-à-vis d'espèces données de Noctuelles, ou toxiques à la fois vis-à-vis des Noctuelles et d'insectes sensibles aux autres  $\delta$ -endotoxines. Ces recombinaisons, effectuées *in vitro* ou *in vivo* avec les séquences nucléotidiques de l'invention et d'autres gènes de  $\delta$ -endotoxines présentant des spécificités toxiques différentes, conduisent à la construction de nouveaux gènes codant pour de nouvelles protéines toxiques hybrides présentant un large spectre activité vis-à-vis des insectes. Ces nouveaux gènes et ces nouvelles protéines entrent également dans le cadre de l'invention.

Dans ces applications, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être transférées et exprimées dans des plantes sensibles à S.littoralis afin de diminuer les ravages causés par ces insectes.

Parmi les plantes à protéger, on citera : le coton, le trèfle, la tomate et la luzerne.

Le transfert du gène tronqué dans des plants de coton, peut être réalisé par transformation mettant en jeu des souches telles que Agrobacterium comme décrit dans (15).

L'invention concerne en outre les cellules végétales, les plantes et les graines renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Les cellules végétales selon l'invention sont des cellules dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que définie ci-dessus. L'invention concerne également les cellules végétales issues de leur division.

Les plantes selon l'invention sont des plantes transformées par un procédé non essentiellement biologique, ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis. Il s'agit aussi de plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication ou de croisements hybrides.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans leur génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

L'invention vise en outre des graines capables de donner une plante telle que définie ci-dessus ou issues d'une telle plante, caractérisées en ce qu'elles ont intégré dans leur génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotide décrite plus haut.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la suite de la description et en se reportant aux exemples dans lesquels :

- la figure 1 représente la carte de restriction des plasmides pHTA6 et pHT6,
- la figure 2, la carte de restriction d'un gène d'une protéine de cristal de la souche aizawai 7.29 cloné dans le plasmide pHTA2 et définissant les fragments d'ADN qui sont utilisés comme sonde,
- la figure 3, présente le fragment de 6.6kb cloné dans pHTA6 et le résultat d'une hybridation effectuée entre ce fragment et les sondes décrites dans la figure 2,
- la figure 4, la carte de restriction du plasmide pHT671, et
- la figure 5, les photographies de tests d'immunodiffusion.

Les expériences d'hybridation réalisées pour la mise en oeuvre de l'invention ont été effectuées à 42°C pendant 24 h. dans une solution contenant 5 x SSC, 30% de formamide et 1 Denhardt (7) en présence de la sonde ADN marquée au <sup>32</sup>P. Les filtres sont lavés à 42°C, 20 mn, en utilisant successivement les solutions suivantes : 5 x SSC dans 30% de formamide, 5 x SSC, 2 x SSC, 1 x SSC et 0.5 x SSC avant séchage à température ambiante.

#### EXEMPLE I - Construction d'une séquence d'ADN de 3kb environ contenant un gène chimère d'une toxine insecticide

Cette construction comprend :

- 1/ la préparation de banques de gènes de B.thuringiensis
- 2/ la sélection et la caractérisation des clones transformants renfermant les gènes d'une protéine du cristal et des séquences nucléotidiques responsables de l'activité larvicide,
- 3/ recombinaison *in vitro* de ces séquences dans un vecteur de clonage avec construction du plasmide pHT671.

Ces différentes étapes sont réalisées comme suit :

## 1 Préparation de banques de gènes de *B. thuringiensis*.

L'ADN total des souches *aizawai* 7-29 et *entomocidus* 6-01 de *Bacillus thuringiensis* est purifié en utilisant la méthode rapportée dans (1) et 50 µg de chaque ADN purifié sont complètement digérés avec l'enzyme de restriction *Pst*I.

L'ADN digéré par *Pst*I est analysé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0.8% et des fragments d'ADN d'une taille de 5 à 8 kb sont récupérés à partir des gels d'agarose, par électroélution, de la manière décrite dans (2).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la souche *aizawai* 7-29 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC18 digéré par *Pst*I selon (3).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la souche *entomocidus* 6-01 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC9 digéré par *Pst*I. Les cellules de *E.coli* JM83 sont transformées avec le mélange de ligature comme décrit dans (4).

Les clones transformants de *E.coli* sont sélectionnés sur milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

## 2: Isolement et caractérisation des clones transformants contenant les gènes d'une protéine de cristal.

A/ Criblage des cellules de *E.coli* transformées à l'aide d'un fragment interne d'un gène de la protéine du cristal marqué au <sup>32</sup>P, utilisé comme sonde :

Des clones transformants contenant des plasmides recombinants portant le gène du cristal sont détectés par hybridation sur colonies, suivant la méthode décrite dans (5), utilisant comme sonde un fragment *Pvu*II de 2 kb du plasmide pBT 15-88 (EMBO J., 1 : 791-799) correspondant à une partie interne du gène de la protéine du cristal, situé sur le chromosome de la souche *berliner* 1715.

B/ Caractérisation des plasmides recombinants présents dans les clones qui réagissent avec la sonde ci-dessus.

Deux plasmides recombinants, pHTA6 et pHTE6, isolés respectivement des banques de gènes construites à partir des souches *aizawai* 7-29 et *entomocidus* 6-01, présentent une homologie avec cette sonde. Dans chaque cas, un fragment d'ADN d'environ 6,6 kb a été cloné.

La carte de restriction des deux plasmides est donnée sur la figure 1. La comparaison des sites de restriction montre que les deux fragments d'ADN clonés semblent identiques.

Afin de délimiter les séquences correspondant au gène de la  $\delta$ -endotoxine, différents fragments d'ADN marqués au <sup>32</sup>P, provenant d'un gène du cristal précédemment caractérisé, et cloné dans le plasmide recombinant pHTA2, sont utilisés comme sondes. Ce dernier gène du cristal également originaire de la souche *aizawai* 7-29 code pour une protéine de 130 kd active contre *P.brassicae* mais pas contre *S.littoralis*. Ce type de gène possède la même carte de restriction que le gène de la  $\delta$ -endotoxine issu de la souche *berliner* 1715. Sur la figure 2, on a rapporté la carte de restriction de ce gène de la protéine du cristal de la souche de *aizawai* 7.29 cloné dans le plasmide pHTA2. Les traits épais indiqués au-dessus de la carte correspondent aux fragments utilisés comme sondes d'hybridation.

Les plasmides pHTA6 et pHTE6 sont hydrolysés par différentes endonucléases de restriction, analysés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et hybridés avec les différentes sondes.

Le transfert de l'ADN sur des filtres de nitrocellulose est réalisé suivant la méthode de SOUTHERN décrite dans (6). L'hybridation est conduite à 42 °C pendant 24 heures dans une solution contenant : 5X SSC, 30% de formamide et un mélange 1X Denhardt décrit dans (7) en présence d'une sonde d'ADN marquée au <sup>32</sup>P. Les filtres sont ensuite lavés à 42 °C pendant 20 minutes, en utilisant successivement les solutions suivantes : 5 SSC dans 50% de formamide, 5 SSC, 2 SSC, 1 SSC et 0,5 SSC avant d'être séchés à la température ambiante.

Les résultats de ces expériences d'hybridation sont résumés sur la figure 3. Il apparaît que chaque extrémité des fragments d'ADN de 6,6 kb clonés présente une homologie avec les sondes. Le fragment *Pst*I-*Kpn*I de 1,5 kb réagissant avec la sonde n° 3 correspond à l'extrémité 3' d'un gène de la protéine du cristal présent à la fois dans les souches *aizawai* 7-29 et *entomocidus* 6-01. Comme il est indiqué sur la figure 3, les sondes n° 1 et n° 2 correspondant à l'extrémité 5' du gène de la  $\delta$ -endotoxine de pHTA2, s'hybrident avec le fragment *Hind*III-*Hinc*II de 1,1 kb contenu dans le plasmide pHTA6. La sonde n° 3 qui couvre l'extrémité 3' du gène de la  $\delta$ -endotoxine de pHTA2, s'hybride avec le fragment *Hind*III-*Pst*I de 0,4kb contenu dans le plasmide pHTA6. Il doit être noté qu'un faible signal d'hybridation est obtenu avec la sonde n° 2 alors que les deux autres sondes donnent des signaux facilement détectables.

A partir de ces résultats, les inventeurs ont établi que le fragment d'ADN *Hind*III-*Pst*I de 3 kb correspond à une grande partie d'un gène de la  $\delta$ -endotoxine qui commence près du site *Hind*III central. Il apparaît clairement au vu des résultats des expériences d'hybridation que le gène de la  $\delta$ -endotoxine

présente des différences substantielles avec ceux caractérisés dans l'art antérieur. Sur la base de ces résultats il a été décidé de cloner le fragment de 3 kb HindIII-PstI dans le vecteur pUC9.

### 3. Construction du plasmide pHT 671 contenant un gène chimère de la toxine insecticide reconstitué.

Le fragment d'ADN HindIII-HincII de 1,1 kb issu du plasmide pHT6 et le fragment d'ADN HincII-PstI de 1,9kb issu du plasmide pHTA6 sont purifiés sur gels d'agarose.

Des quantités égales des deux fragments d'ADN purifiés et de l'ADN de pUC9 digéré avec HindIII et PstI sont mélangées et ligaturées. Le mélange de ligature est utilisé pour transformer des cellules compétentes de E.coli JM83, puis les cellules transformées de E.coli sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline. L'un des clones recombinants intéressant examiné contient un plasmide désigné par pHT671, dont la carte de restriction a été déterminée et est représentée sur la figure 4. Ce plasmide (pHT671) contient un fragment d'ADN de 3 kb inséré dans le vecteur pUC9. Cette séquence d'ADN a la même carte de restriction que les fragments HindIII-PstI de 3 kb contenus dans les plasmides pHTA6 et pHT6, mais correspond à une molécule d'ADN reconstituée construite par recombinaison in vitro à partir de séquences d'ADN provenant des souches aizawai 7-29 d'une part et entomocidus 6-01 d'autre part.

#### EXEMPLE II : Etude de la séquence nucléotidique de la région du promoteur et de la région codant pour la partie NH<sub>2</sub> terminale de la $\delta$ -endotoxine active contre les Noctuidae.

Le fragment HindIII-HincII de pHT671 est séquencé à conformé la méthode décrite dans (8) en utilisant un système M13. Pour obtenir des fragments d'ADN clonés se chevauchant partiellement qui seront utilisés dans le séquençage de l'ADN, on a recours à la méthode de sous-clonage par délétion dans M13, développée par DALE et al (9).

La séquence de 940 nucléotides du fragment HindIII-HincII qui est d'une longueur d'environ 1 kilobase correspond à l'enchaînement ci-dessus.

L'analyse de cette séquence montre que la plus grande phase ouverte de lecture commence à la position 241 et qu'un site potentiel de liaison aux ribosomes GGAGG se trouve six paires de base en amont de ce codon ATG (position 230 à 235). La région localisée entre les nucléotides 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon ATG) est fortement homologe à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) séquencée par WONG et al (1983) et décrite dans (16) et dont les auteurs ont montré qu'elle contient trois promoteurs Btl, BtII, et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E.coli respectivement. La comparaison entre les séquences en acides aminés déduites des 750 premiers nucléotides des gènes de BTK et pHT671, montre que ces polypeptides présentent des différences significatives au niveau de la moitié N-terminale de la partie active issue de la protoxine (seulement 66% d'homologie stricte). Il est important de noter que c'est la première fois qu'un gène de la  $\delta$ -endotoxine isolé à partir d'une souche active contre les lépidoptères code pour un polypeptide qui présente des différences substantielles dans cette région. En effet, ce domaine N-terminal apparaît fortement conservé (plus de 97% d'homologie stricte) parmi tous les gènes du cristal actifs sur lépidoptères qui ont été séquencés jusqu'à présent. Par ailleurs, les inventeurs ont montré que le taux de variabilité est du même ordre si l'on considère les séquences nucléotidiques de pHT671 et des autres gènes de type lépidoptères.

#### EXEMPLE III : Construction d'une séquence d'ADN de 2,7kb environ contenant un gène d'une toxine larvicide.

Pour réaliser cette construction on a utilisé l'ADN de la souche aizawai 7.29 de B.thuringiensis jusqu'à l'étape de réalisation du plasmide pHTA6 telle que décrite dans l'exemple I.

Le fragment HindIII-PstI d'environ 2,7kb obtenu à partir du plasmide pHTA6 a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pUC9, préalablement hydrolysé par les enzymes de restriction HindIII-PstI, pour donner le plasmide pHT71.

#### EXEMPLE IV : Etude de la séquence de nucléotides constituant le plasmide pHT71 codant pour un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles.

Le fragment HindIII-PstI de 2,7kb de pHTA6, qui a été sous-cloné dans pHT71, a été séquencé par la technique de Sanger et al.(8) en utilisant le phage M13mp19 et le système de sous-clonage par délétions développé par Dale et al(9). Ce système permet d'obtenir des phages M13 contenant une série de fragments d'ADN se chevauchant partiellement et qui peuvent être utilisés pour le séquençage de l'ADN.



La séquence de nucléotides de ce fragment de 2.7kb qui correspond à l'enchaînement (III) donné ci-dessus, a été déterminée sur les 2 brins d'ADN, exception faite des 212 derniers nucléotides (position 2500 à 2711) qui n'ont été séquencés que sur 1 seul brin.

La séquence nucléotidique de ce fragment Hind-III-PstI a une longueur de 2711 nucléotides. Ce fragment contient le promoteur potentiel ainsi que la plus grande partie du gène de la  $\delta$ -endotoxine active sur S.littoralis.

EXEMPLE V : Etude de la toxicité spécifique des clones recombinants de E.coli JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) contre S.littoralis.

10

La toxicité des clones recombinants de E.coli JM83 contenant pHT671 et de E.coli JM83 contenant pHT71 a été déterminée par des tests biologiques sur des chenilles de l'espèce P.brassicae et S.littoralis comme décrit par LECADET et MARTOURET dans (10). Les résultats ont été comparés avec la toxicité spécifique des protéines de cristal natives et purifiées à partir des souches berliner 1715 et aizawai 7-29 entomocidus 6.01 B.cereus 569 (contenant le plasmide pBT45, pAM $\beta$ 1) contre les deux espèces d'insectes. La toxicité spécifique du clone recombinant et des souches de B.thuringiensis est exprimée en termes d' "indice de spécificité" défini précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 1 ci-après.

Dans ce tableau, pour des souches de E.coli, la concentration 1 correspond à une culture bactérienne de 14 heures concentrée 20 fois, désintégrée par ultrasons ; pour les souches de B.thuringiensis la concentration est exprimée en  $\mu$ g de protéine cristal par  $\mu$ l de préparation. L'activité toxique des préparations a été testée par ingestion forcée sur des chenilles au cinquième stade de développement avec 5  $\mu$ l de préparation, ou par une technique d'ingestion libre en utilisant des larves au deuxième stade de développement.

25

TABLEAU 1

Souches et plasmides	S.littoralis		P.brassicae	Indice de spécificité CL50 <u>S.littoralis</u> CL50 <u>P.brassicae</u>
	CL50 2ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	
JM83 (pUC18)	> 1	> 1	> 1	-
JM83 (pHT671)	0,04	0,13	0,72	0,2
JM83 (pHTA2)	> 1	> 1	0,03	> 30
JM83 (pHTA4)	> 1	> 1	> 1	-
JM83 (pHT71)	ND	0,5	> 1	< 0,5
<u>berliner 1715</u> cristaux natifs	ND	0,11	0,007	15,7
<u>aizawai 7.29</u> cristaux natifs	ND	0,02	0,04	0,5
<u>entomocidus 601</u> cristaux natifs	ND	0,028	0,012	2,3
<u>B.cereus 569</u> (pBT45,pAM $\beta$ 1)	ND	0,38	0,054	7

55

L'examen des valeurs de CL50 résumées dans ce tableau 1 montre que les extraits de protéine des clones recombinants JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont préférentiellement toxiques contre S.littoralis. En second lieu une comparaison des valeurs de 1 indice de spécificité montre que l'activité larvicide des clones recombinants est plus spécifique à raison de 2,5 fois envers S.littoralis que les protéines du cristal

natives de la souche aizawai. Par ailleurs, les clones recombinants de JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont très actifs contre un autre insecte de la famille des Noctuidae, Mamestra brassicae (pour le clone JM83 (pHT671) par exemple, la valeur CL50 est de 0,02, en utilisant des larves du deuxième stade de développement).

5 Ces deux résultats montrent que le gène de la toxine larvicide construit et cloné dans les plasmides pHT671 et pHT71 code pour une protéine spécifiquement active contre S.littoralis.

D'autres préparations obtenues à partir de clones recombinants contenant des plasmides portant des gènes codant pour d'autres types de  $\delta$ -endotoxines (pHTA2 et pHTA4) ne sont pas actives sur S.littoralis : on peut voir que le plasmide pHTA2 code pour une  $\delta$ -endotoxine spécifiquement active sur P.brassicae 10 alors que le plasmide pHTA4 code pour une  $\delta$ -endotoxine dont l'insecte cible n'a pas encore été identifié. On peut également voir que les inclusions cristallines produites par une souche de Bacillus cereus qui a reçu le plasmide pBT45, un des plasmides de la souche aizawai 7-29 qui porte aussi un gène de  $\delta$ -endotoxine (le gène d'origine plasmidique de la souche aizawai 7-29), sont également spécifiquement actives sur P.brassicae.

15 Des résultats similaires sont obtenus en utilisant, à la place des extraits bactériens bruts, des extraits protéiques solubles préparés à partir de différents clones recombinants de E.coli.

Sur la base des valeurs de la CL50 rapportées dans le tableau ci-dessus et d'un poids individuel moyen de 41 mg par larve L5 (cinquième stade larvaire) de S.littoralis, la valeur de la DL50 a été estimée à 2,4  $\mu$ g/gramme de larve pour les cristaux natifs de la souche aizawai 7-29.

20 Sur ces mêmes bases et sur la base de facteurs d'équivalence permettant de passer de la masse bactérienne totale à la quantité de protéines spécifiques (2% environ des protéines totales chez E.coli JM83 (pHT671)), la DL50 correspondant à la toxine produite par l'expression chez E.coli JM83 du gène selon l'invention cloné dans le plasmide pHT671, a été déterminée et estimée à une valeur proche de 5,5 à 6  $\mu$ g/gramme de larve.

25 Sur ces mêmes bases et après détermination de la CL50 d'extraits protéiques solubles préparés à partir de cultures broyées de E.coli JM83 (pHT671), la valeur de la DL50 correspondant à la toxine présente dans ces extraits a été estimée à 4,15  $\mu$ g/gramme de larve.

Dans les deux cas et particulièrement dans le cas des broyats de E.coli, les valeurs de DL50 calculées sont approximatives et supérieures à celle des cristaux natifs, puisqu'il ne s'agit pas de toxine purifiée. 30 Cependant ces données indiquent sans ambiguïté que le gène exprimé par pHT671 détermine une  $\delta$ -endotoxine présentant la spécificité vis-à-vis de S.littoralis. En effet, le même type d'estimation réalisé avec des extraits de E.coli JM83 (pHTA2) portant un gène de  $\delta$ -endotoxine de spécificité différente conduit à des valeurs 30 à 50 fois supérieures de la DL50 des extraits solubles, vis-à-vis de S.littoralis (135 à 350  $\mu$ g/gramme de larve).

35 Les données qui précèdent permettront aisément à l'homme de l'art d'élaborer des compositions larvicides actives avec les protéines de l'invention.

D'autres expériences de toxicité ont été réalisées en utilisant des larves au deuxième stade larvaire de M.brassicae, S.frugiperda et S.littoralis. Les résultats obtenus, exprimés en termes de LC 50 comme défini pour le tableau 1, sont donnés dans le tableau 2.

40

45

50

55

TABLEAU 2  
 ACTIVITE DES CLONES RECOMBINANTS  
 CONTRE LES LARVES D'INSECTES  
 DE LA FAMILIE DES NOCTUIDAE  
M. BRASSICAE, S. FRUGIPERDA AND S. LITTORALIS

SOUCHES ET PLASMIDES	LARVE D'INSECTE ET STADE	<u>M. BRASSICAE</u>		<u>S. FRUGIPERDA</u>		<u>S. LITTORALIS</u>	
		CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE	CL50 2ème STADE
JM 83 (pUC18)		NT		NT		NT	
JM 83 (pHTA2)		> 1		0,51		0,9	
JM 83 (pHT671)		0,02		0,5		0,03	
JM 83 (pHT71)		ND		ND		0,03	
JM 83 (pHTA4)		> 1		0,54		> 1	

Il ressort de l'examen du tableau 2 que les extraits bactériens bruts du clone recombinant JM83 (pHT671) sont toxiques vis-à-vis de M.brassicae et de S.littoralis (les valeurs de CL50 sont respectivement de 0.02 et 0.03) et faiblement toxiques vis-à-vis de S.frugiperda (CL50 de 0.5).

Les extraits du clone recombinant E.coli JM83 (pHTA2) sont faiblement actifs à l'égard de S.frugiperda et de S.littoralis et pas du tout toxique à l'égard de M.brassicae. Les extraits du clone recombinant JM83

(pHTA4) ne sont pas toxiques vis-à-vis de M.brassicæ et de S.littoralis et sont faiblement toxiques à l'égard de S.frugiperda.

Ces résultats confirment la forte toxicité spécifique des protéines obtenues à partir de pHT71 et de pHT671 à l'égard de S.littoralis et montrent que cette classe de protéine de cristal est aussi très active à l'égard de M.brassicæ.

EXEMPLE VI : Etude de la spécificité des polypeptides exprimés par les clones formés par introduction des plasmides pHT671 et pHT71 dans E.coli.

Cette étude a été réalisée grâce à des tests d'immuno-diffusion. Les résultats sont rapportés sur la figure 5 (qui comprend les figures 5A et 5B).

La mise en oeuvre de l'expérience d'immunodiffusion a été réalisée conformément au protocole suivant :

Des extraits solubles de protéines de clones E.coli contenant les plasmides pHT671, pHTA4, pHTA2 ou pHT71, pUC18 ont été placés respectivement dans les puits n° 2, 3, 4, 5, 6. Un échantillon d'un cristal purifié solubilisé de aizawai 7-29 a été placé dans le puits n° 1 afin de servir de contrôle positif.

Dans le test rapporté sur la figure 5A un antisérum contre toutes les  $\delta$ -endotoxines de aizawai 7-29, contenant des anticorps de lapin dirigés contre les protéines du cristal solubilisées a été utilisé et placé dans le puits central.

Une ligne d'immunoprécipitation a été observée dans tous les cas excepté dans le cas de l'extrait de E.coli contenant le vecteur plasmidique seul (puits n° 6).

On a remarqué que les lignes d'immunoprécipitation issues des puits n° 4 et n° 5 croisent, ce qui montre que les produits codés par les plasmides pHTA2 et pHT71 respectivement présentent des déterminants anti-géniques différents.

Dans le test rapporté sur la figure 5B, l'anti-sérum utilisé contenait des anticorps polyclonaux de lapin contre les protéines du cristal de berliner 1715.

Une ligne d'immunoprécipitation a été observée avec les extraits de E.coli JM83 (pHTA4) (puits n° 3) JM83 (pHTA2) (puits n° 4). En revanche les clones E.coli JM83 (pHT71) (puits n° 5) JM83 (pHT671) (puits n° 2) ou JM83 (pUC9) (puits n° 6) ne donnent pas d'immunoprécipitation.

On peut en déduire que les gènes du cristal isolés dans pHTA4 et pHTA2 expriment des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de berliner 1715, souche qui n'est pas spécifiquement active vis-à-vis de S.littoralis.

En revanche, les extraits bruts de E.coli contenant les plasmides pHT671 et pHT71 contiennent des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de la souche aizawai 7.29, qui ne sont pas liés sur le plan immunogène avec les protéines du cristal de la souche berliner 1715.

Ces résultats confirment ceux donnés précédemment en rapport avec la spécificité des gènes isolés dans les plasmides pHT71 et pHT671.

Des essais de précipitation antigène-anticorps ont permis de déterminer le niveau d'expression des gènes de  $\delta$ -endotoxine dans différents clones recombinants.

Les résultats obtenus ont montré que la protéine du cristal représente entre 7 et 10% de protéines cellulaires totales de E.coli JM83 (pHTA2), entre 2 et 3% dans E.coli JM83 (pHT671) et entre 0,5 et 1% dans E.coli JM83 (pHTA4) et E.coli JM83 (pHT71).

Les références bibliographiques dont il est question dans les exemples sont les suivantes :

- (1) Klier, A.F., LECADET, M.-M. and DEDONDER, R., 1973, Sequential modifications of RNA polymerase during sporogenesis in Bacillus thuringiensis, Eur. J. Biochem., **36** : 317-327.
- (2) MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York
- (3) VIEIRA, J. and MESSING, J., 1982, The pUC plasmids, and M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, Gene, **19** : 259-268.
- (4) LEDERBERG, E.M. and COHEN, S.N., 1974, Transformation of Salmonella thyphimurium by plasmid deoxyribonucleic acid, J. Bacteriol., **119** : 1072-1074.
- (5) GRUNSTEIN, M. and HOGNESS, D.S., 1975, Colony hybridization, a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **72** : 3961-3965.
- (6) SOUTHERN, E.M., 1975, Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Molec. Biol., **98**, 503-517.
- (7) DENHARDT, D.T. 1976, A membrane filter taking for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm., **23** : 641-646.

- (8)SANGER, F., NICKLENS, S. and COULSON, A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 : 5463-5467.
- (9)DALE et al.(1985) A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA. Plasmid 1985, 13 : 31-40
- 5 (10)LECADET.M.M. et MARTOURET D.1987. Host specificity of the Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin toward Lepidopteran species : Spodoptera littoralis Bdv and Pieris brassicae L. J. of Invert. Pathol., 49 - (n° 1) : 37-48.
- (11)CHANG et al., 1979. High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA- Mol Gen Genet 168:111 115
- 10 (12)HEIERSON et al., 1987. Transformation of vegetative cells of Bacillus thuringiensis by plasmid DNA, Journal of Bacteriology, Mar.1987. p.1147-1152.
- (13)KLIER et al., 1983, Mating between Bacillus subtilis and Bacillus thuringiensis and transfer of cloned crystal genes. Mol Gen Genet (1983) 191:257 262
- (14)LERECLUS et al., 1983. Isolation of a DNA. sequence related to several plasmids from Bacillus thuringiensis after a mating involving the Streptococcus faecalis plasmid pAM $\beta$ 1. Mol Gen Genet (1983) 191:307-313
- 15 (15)UMBECK et al., 1987. Genetically transformed cotton (Gossypium hirsutum L.) plants - Biotechnology vol.5 March 1987.
- (16)WONG et al., 1983. transcriptional and translational start sites for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. of Biol. Chem., 258 : 1960-1967.
- 20 (17)OBUKOWICZ M.et al (1986). Tn<sup>5</sup> mediated integration of the  $\delta$ -endotoxin gene from B. thuringiensis into the chromosome of root colonizing Pseudomonas. J. Bacteriol., 168, 982-989.
- (18)SIMON, R. et al. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology, 1, pp. 784-791.
- 25 (19)Schnepf et al.(1985) The amino acid sequence of a crystal protein from Bacillus thuringiensis deduced from the DNA base sequence. J BIOL Chem 260 : 6264-6372.
- (20)Adang et al. (1985) characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. Gene 36 : 289-300.
- (21)Wabiko et al.(1986) Bacillus thuringiensis entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. DNA 5 : 305-314.
- 30 (22)Hofte et al.(1986) Structural and functional analysis of a cloned  $\delta$ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis berliner 1715. Eur J Biochem 161 : 273-280.
- (23)Shibano et al.(1986) Complete structure of an insecticidal crystal protein gene from Bacillus thuringiensis. In : Bacillus molecular genetics and biotechnology applications. J.Ganesan, A.T., Hoch, J.A.(eds). Academic Press 307-320.
- 35 (24)Oeda et al.(1987) Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of Bacillus thuringiensis strain aizawai IPL7 and its high-level expression in Escherichia coli. Gene 53 : 113-119.

#### Revendications

- 40 1. Séquence d'ADN codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, caractérisée en ce qu'elle contient un fragment d'ADN d'environ 3 kb correspondant au fragment de restriction HindIII - PstI provenant de B.thuringiensis souche aizawai 7.29.
- 45 2. Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce que le fragment de restriction HindIII - PstI est capable d'hybrider avec les sondes 1, 2, 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2.
- 50 3. Séquence d'ADN selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'elle comporte des sites dans l'ordre suivant : HindIII - HincII - BglII - KpnI - HindIII - PstI.
4. Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.
- 55 5. Séquence d'ADN selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle code pour polypeptide toxique de S.littoralis.

6. Séquence d'ADN codant pour un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment d'ADN correspondant au fragment de restriction HindIII - HincII d'environ 1.1 kb provenant de B.thuringiensis souche entomocidus 6-01 fusionné avec un fragment de restriction HincII - PstI d'environ 1.9 kb provenant de B.thuringiensis souche aizawai 729.
7. Séquence d'ADN selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.
8. Séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle a la capacité d'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant:

```

15      52
      GTC TAC TTC ACA GCG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT GCG GCA TAT ATT GAT
      112
      ATT TTA TAA AAT TTC TTA CGT TTT TTC TAT TTT TTC ATA ACA TGT GTC ATA TGT ATT AAA
      172
      TCG TGG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA ATA AAA AAA CCG
20      232
      AGG TAT TTT ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT
      292
      CCT GAA GAA GTA CTT TTG GAT GGA GAA CCG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT
25      352
      TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GCG GCA GCA TTT TTA GTT
      412
      GGA TTA ATA GAT TTT GTA TCG GGA ATA GTT GCG CCT TCT CAA TCG GAT GCA TTT CTA GTA
      472
30      CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT CAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT AGG AAT GCT GCT ATT GCT
      532
      AAT TTA GAA GCA TTA GCA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TCG CAA
      592
35      GAA GAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGC ACC AGA GTA ATT GAT CCG TTT CGT ATA CTT GAT
      652
      GCG CTA CTT GAA AGC GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCG CTT TTA
      712
40      TCC GTT TAT GCT CAA GCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA ATT TTT
      772
      GGA GAA AGA TCG GCA TTC ACA ACC ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT ACC
      832
45      CAT ATT GAT GAA TAT GCT GAT GAC TGT CCA AAT ACC TAT AAT CCG GCA TTA AAT AAT TTA
      892
      CCG AAA TCT ACC TAT CAA GAT TCG ATA ACA TAT AAT CGA TTA CCG AGA GAC TTA ACA TTC
      952
      ACT GTA TTA GAT ATC GCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC
50

```

cu à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement suivant :

55

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70  
 71  
 72  
 73  
 74  
 75  
 76  
 77  
 78  
 79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

991  
 1081  
 1171  
 1261  
 1351  
 1441  
 1531  
 1621  
 1711  
 1801  
 1891  
 1981  
 2071  
 2161  
 2251  
 2341  
 2431  
 2521  
 2611  
 2701  
 2791  
 2881  
 2971  
 3061  
 3151  
 3241  
 3331  
 3421  
 3511  
 3601  
 3691  
 3781  
 3871  
 3961  
 4051  
 4141  
 4231  
 4321  
 4411  
 4501  
 4591  
 4681  
 4771  
 4861  
 4951  
 5041  
 5131  
 5221  
 5311  
 5401  
 5491  
 5581  
 5671  
 5761  
 5851  
 5941  
 6031  
 6121  
 6211  
 6301  
 6391  
 6481  
 6571  
 6661  
 6751  
 6841  
 6931  
 7021  
 7111  
 7201  
 7291  
 7381  
 7471  
 7561  
 7651  
 7741  
 7831  
 7921  
 8011  
 8101  
 8191  
 8281  
 8371  
 8461  
 8551  
 8641  
 8731  
 8821  
 8911  
 9001  
 9091  
 9181  
 9271  
 9361  
 9451  
 9541  
 9631  
 9721  
 9811  
 9901  
 10001  
 10091  
 10181  
 10271  
 10361  
 10451  
 10541  
 10631  
 10721  
 10811  
 10901  
 11001  
 11091  
 11181  
 11271  
 11361  
 11451  
 11541  
 11631  
 11721  
 11811  
 11901  
 12001  
 12091  
 12181  
 12271  
 12361  
 12451  
 12541  
 12631  
 12721  
 12811  
 12901  
 13001  
 13091  
 13181  
 13271  
 13361  
 13451  
 13541  
 13631  
 13721  
 13811  
 13901  
 14001  
 14091  
 14181  
 14271  
 14361  
 14451  
 14541  
 14631  
 14721  
 14811  
 14901  
 15001  
 15091  
 15181  
 15271  
 15361  
 15451  
 15541  
 15631  
 15721  
 15811  
 15901  
 16001  
 16091  
 16181  
 16271  
 16361  
 16451  
 16541  
 16631  
 16721  
 16811  
 16901  
 17001  
 17091  
 17181  
 17271  
 17361  
 17451  
 17541  
 17631  
 17721  
 17811  
 17901  
 18001  
 18091  
 18181  
 18271  
 18361  
 18451  
 18541  
 18631  
 18721  
 18811  
 18901  
 19001  
 19091  
 19181  
 19271  
 19361  
 19451  
 19541  
 19631  
 19721  
 19811  
 19901  
 20001  
 20091  
 20181  
 20271  
 20361  
 20451  
 20541  
 20631  
 20721  
 20811  
 20901  
 21001  
 21091  
 21181  
 21271  
 21361  
 21451  
 21541  
 21631  
 21721  
 21811  
 21901  
 22001  
 22091  
 22181  
 22271  
 22361  
 22451  
 22541  
 22631  
 22721  
 22811  
 22901  
 23001  
 23091  
 23181  
 23271  
 23361  
 23451  
 23541  
 23631  
 23721  
 23811  
 23901  
 24001  
 24091  
 24181  
 24271  
 24361  
 24451  
 24541  
 24631  
 24721  
 24811  
 24901  
 25001  
 25091  
 25181  
 25271  
 25361  
 25451  
 25541  
 25631  
 25721  
 25811  
 25901  
 26001  
 26091  
 26181  
 26271  
 26361  
 26451  
 26541  
 26631  
 26721  
 26811  
 26901  
 27001  
 27091  
 27181  
 27271  
 27361  
 27451  
 27541  
 27631  
 27721  
 27811  
 27901  
 28001  
 28091  
 28181  
 28271  
 28361  
 28451  
 28541  
 28631  
 28721  
 28811  
 28901  
 29001  
 29091  
 29181  
 29271  
 29361  
 29451  
 29541  
 29631  
 29721  
 29811  
 29901  
 30001  
 30091  
 30181  
 30271  
 30361  
 30451  
 30541  
 30631  
 30721  
 30811  
 30901  
 31001  
 31091  
 31181  
 31271  
 31361  
 31451  
 31541  
 31631  
 31721  
 31811  
 31901  
 32001  
 32091  
 32181  
 32271  
 32361  
 32451  
 32541  
 32631  
 32721  
 32811  
 32901  
 33001  
 33091  
 33181  
 33271  
 33361  
 33451  
 33541  
 33631  
 33721  
 33811  
 33901  
 34001  
 34091  
 34181  
 34271  
 34361  
 34451  
 34541  
 34631  
 34721  
 34811  
 34901  
 35001  
 35091  
 35181  
 35271  
 35361  
 35451  
 35541  
 35631  
 35721  
 35811  
 35901  
 36001  
 36091  
 36181  
 36271  
 36361  
 36451  
 36541  
 36631  
 36721  
 36811  
 36901  
 37001  
 37091  
 37181  
 37271  
 37361  
 37451  
 37541  
 37631  
 37721  
 37811  
 37901  
 38001  
 38091  
 38181  
 38271  
 38361  
 38451  
 38541  
 38631  
 38721  
 38811  
 38901  
 39001  
 39091  
 39181  
 39271  
 39361  
 39451  
 39541  
 39631  
 39721  
 39811  
 39901  
 40001  
 40091  
 40181  
 40271  
 40361  
 40451  
 40541  
 40631  
 40721  
 40811  
 40901  
 41001  
 41091  
 41181  
 41271  
 41361  
 41451  
 41541  
 41631  
 41721  
 41811  
 41901  
 42001  
 42091  
 42181  
 42271  
 42361  
 42451  
 42541  
 42631  
 42721  
 42811  
 42901  
 43001  
 43091  
 43181  
 43271  
 43361  
 43451  
 43541  
 43631  
 43721  
 43811  
 43901  
 44001  
 44091  
 44181  
 44271  
 44361  
 44451  
 44541  
 44631  
 44721  
 44811  
 44901  
 45001  
 45091  
 45181  
 45271  
 45361  
 45451  
 45541  
 45631  
 45721  
 45811  
 45901  
 46001  
 46091  
 46181  
 46271  
 46361  
 46451  
 46541  
 46631  
 46721  
 46811  
 46901  
 47001  
 47091  
 47181  
 47271  
 47361  
 47451  
 47541  
 47631  
 47721  
 47811  
 47901  
 48001  
 48091  
 48181  
 48271  
 48361  
 48451  
 48541  
 48631  
 48721  
 48811  
 48901  
 49001  
 49091  
 49181  
 49271  
 49361  
 49451  
 49541  
 49631  
 49721  
 49811  
 49901  
 50001  
 50091  
 50181  
 50271  
 50361  
 50451  
 50541  
 50631  
 50721  
 50811  
 50901  
 51001  
 51091  
 51181  
 51271  
 51361  
 51451  
 51541  
 51631  
 51721  
 51811  
 51901  
 52001  
 52091  
 52181  
 52271  
 52361  
 52451  
 52541  
 52631  
 52721  
 52811  
 52901  
 53001  
 53091  
 53181  
 53271  
 53361  
 53451  
 53541  
 53631  
 53721  
 53811  
 53901  
 54001  
 54091  
 54181  
 54271  
 54361  
 54451  
 54541  
 54631  
 54721  
 54811  
 54901  
 55001  
 55091  
 55181  
 55271  
 55361  
 55451  
 55541  
 55631  
 55721  
 55811  
 55901  
 56001  
 56091  
 56181  
 56271  
 56361  
 56451  
 56541  
 56631  
 56721  
 56811  
 56901  
 57001  
 57091  
 57181  
 57271  
 57361  
 57451  
 57541  
 57631  
 57721  
 57811  
 57901  
 58001  
 58091  
 58181  
 58271  
 58361  
 58451  
 58541  
 58631  
 58721  
 58811  
 58901  
 59001  
 59091  
 59181  
 59271  
 59361  
 59451  
 59541  
 59631  
 59721  
 59811  
 59901  
 60001  
 60091  
 60181  
 60271  
 60361  
 60451  
 60541  
 60631  
 60721  
 60811  
 60901  
 61001  
 61091  
 61181  
 61271  
 61361  
 61451  
 61541  
 61631  
 61721  
 61811  
 61901  
 62001  
 62091  
 62181  
 62271  
 62361  
 62451  
 62541  
 62631  
 62721  
 62811  
 62901  
 63001  
 63091  
 63181  
 63271  
 63361  
 63451  
 63541  
 63631  
 63721  
 63811  
 63901  
 64001  
 64091  
 64181  
 64271  
 64361  
 64451  
 64541  
 64631  
 64721  
 64811  
 64901  
 65001  
 65091  
 65181  
 65271  
 65361  
 65451  
 65541  
 65631  
 65721  
 65811  
 65901  
 66001  
 66091  
 66181  
 66271  
 66361  
 66451  
 66541  
 66631  
 66721  
 66811  
 66901  
 67001  
 67091  
 67181  
 67271  
 67361  
 67451  
 67541  
 67631  
 67721  
 67811  
 67901  
 68001  
 68091  
 68181  
 68271  
 68361  
 68451  
 68541  
 68631  
 68721  
 68811  
 68901  
 69001  
 69091  
 69181  
 69271  
 69361  
 69451  
 69541  
 69631  
 69721  
 69811  
 69901  
 70001  
 70091  
 70181  
 70271  
 70361  
 70451  
 70541  
 70631  
 70721  
 70811  
 70901  
 71001  
 71091  
 71181  
 71271  
 71361  
 71451  
 71541  
 71631  
 71721  
 71811  
 71901  
 72001  
 72091  
 72181  
 72271  
 72361  
 72451  
 72541  
 72631  
 72721  
 72811  
 72901  
 73001  
 73091  
 73181  
 73271  
 73361  
 73451  
 73541  
 73631  
 73721  
 73811  
 73901  
 74001  
 74091  
 74181  
 74271  
 74361  
 74451  
 74541  
 74631  
 74721  
 74811  
 74901  
 75001  
 75091  
 75181  
 75271  
 75361  
 75451  
 75541  
 75631  
 75721  
 75811  
 75901  
 76001  
 76091  
 76181  
 76271  
 76361  
 76451  
 76541  
 76631  
 76721  
 76811  
 76901  
 77001  
 77091  
 77181  
 77271  
 77361  
 77451  
 77541  
 77631  
 77721  
 77811  
 77901  
 78001  
 78091  
 78181  
 78271  
 78361  
 78451  
 78541  
 78631  
 78721  
 78811  
 78901  
 79001  
 79091  
 79181  
 79271  
 79361  
 79451  
 79541  
 79631  
 79721  
 79811  
 79901  
 80001  
 80091  
 80181  
 80271  
 80361  
 80451  
 80541  
 80631  
 80721  
 80811  
 80901  
 81001  
 81091  
 81181  
 81271  
 81361  
 81451  
 81541  
 81631  
 81721  
 81811  
 81901  
 82001  
 82091  
 82181  
 82271  
 82361  
 82451  
 82541  
 82631  
 82721  
 82811  
 82901  
 83001  
 83091  
 83181  
 83271  
 83361  
 83451  
 83541  
 83631  
 83721  
 83811  
 83901  
 84001  
 84091  
 84181  
 84271  
 84361  
 84451  
 84541  
 84631  
 84721  
 84811  
 84901  
 85001  
 85091  
 85181  
 85271  
 85361  
 85451  
 85541  
 85631  
 85721  
 85811  
 85901  
 86001  
 86091  
 86181  
 86271  
 86361  
 86451  
 86541  
 86631  
 86721  
 86811  
 86901  
 87001  
 87091  
 87181  
 87271  
 87361  
 87451  
 87541  
 87631  
 87721  
 87811  
 87901  
 88001  
 88091  
 88181  
 88271  
 88361  
 88451  
 88541  
 88631  
 88721  
 88811  
 88901  
 89001  
 89091  
 89181  
 89271  
 89361  
 89451  
 89541  
 89631  
 89721  
 89811  
 89901  
 90001  
 90091  
 90181  
 90271  
 90361  
 90451  
 90541  
 90631  
 90721  
 90811  
 90901  
 91001  
 91091  
 91181  
 91271  
 91361  
 91451  
 91541  
 91631  
 91721  
 91811  
 91901  
 92001  
 92091  
 92181  
 92271  
 92361  
 92451  
 92541  
 92631  
 92721  
 92811  
 92901  
 93001  
 93091  
 93181  
 93271  
 93361  
 93451  
 93541  
 93631  
 93721  
 93811  
 93901  
 94001  
 94091  
 94181  
 94271  
 94361  
 94451  
 94541  
 94631  
 94721  
 94811  
 94901  
 95001  
 95091  
 95181  
 95271  
 95361  
 95451  
 95541  
 95631  
 95721  
 95811  
 95901  
 96001  
 96091  
 96181  
 96271  
 96361  
 96451  
 96541  
 96631  
 96721  
 96811  
 96901  
 97001  
 97091  
 97181  
 97271  
 97361  
 97451  
 97541  
 97631  
 97721  
 97811  
 97901  
 98001  
 98091  
 98181  
 98271  
 98361  
 98451  
 98541  
 98631  
 98721  
 98811  
 98901  
 99001  
 99091  
 99181  
 99271  
 99361  
 99451  
 99541  
 99631  
 99721  
 99811  
 99901  
 100001  
 100091  
 100181  
 100271  
 100361  
 100451  
 100541  
 100631  
 100721  
 100811  
 100901  
 101001  
 101091  
 101181  
 101271  
 101361  
 101451  
 101541  
 101631  
 101721  
 101811  
 101901  
 102001  
 102091  
 102181  
 102271  
 102361  
 102451  
 102541  
 102631  
 102721  
 102811  
 102901  
 103001  
 103091  
 103181  
 103271  
 103361  
 103451  
 103541  
 103631  
 103721  
 103811  
 103901  
 104001  
 104091  
 104181  
 104271  
 104361  
 104451  
 104541  
 104631  
 104721  
 104811  
 104901  
 105001  
 105091  
 105181  
 105271  
 105361  
 105451  
 105541  
 105631  
 105721  
 105811  
 105901  
 106001  
 106091  
 106181  
 106271  
 106361  
 106451  
 106541  
 106631  
 106721  
 106811  
 106901  
 107001  
 107091  
 107181  
 107271  
 107361  
 107451  
 107541  
 107631  
 107721  
 107811  
 107901  
 108001  
 108091  
 108181  
 108271  
 108361  
 108451  
 108541  
 108631  
 108721  
 108811



5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

- 55 9. Séquence de nucléotides codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement (I) ou (III) défini à la revendication 8.

10. Séquence de nucléotides selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce qu'elle présente un codon d'initiation ATG situé en position 241.
11. Séquence selon l'une quelconque des revendications 8 à 10 caractérisée par un site de liaison aux ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.
12. Séquence selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisée en ce qu'elle comporte la séquence comprise entre les nucléotides en position 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon d'initiation ATG) qui est homologue à raison d'environ au moins 70% à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki-HD1 Dipel (BTK) qui contient les trois promoteurs Btl, BtII et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E. coli respectivement.
13. Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (II) d'acides aminés ci-après:

15

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASP

20

PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE

25

SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL

GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL

30

GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA

ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU

35

GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP

GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU

40

SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE

GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG

45

HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU

PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU

50

THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

55

ou caractérisée en

ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV) d'acides aminés ci-après :

60

65

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

271 MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE  
 281 PHE TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE SER LEU SER  
 291 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER  
 301 GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU  
 311 GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE  
 321 ARG ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR  
 331 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU  
 341 TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER  
 351 THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

991

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER  
 1081  
 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL PHE GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE  
 1171  
 THR ASP TAP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TAP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ASN ILE THR SER PRO  
 1281  
 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG  
 1331  
 LEU LEU GLN GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU GLY VAL PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYA  
 1441  
 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS  
 1531  
 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL VAL PHE SER TAP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN  
 1621  
 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TAP GLY GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE  
 1711  
 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG  
 1801  
 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

11M PHE PRO LEU GLU LYS THR PHE GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR IAN ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE  
 1901 PHE ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE  
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN  
 2161 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP  
 2231 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE  
 2341 GLN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TAP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU  
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG  
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER  
 2611 LEU TAP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TAP ASN PRO ASP LEU ASP  
 2701 CYS SER CYS

- 55 14. Vecteur recombinant d'expression et de clonage comportant au moins une partie de la séquence nucléotidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 13.

15. Plasmide selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit de pHT671 tel que représenté sur la figure 4, ou de pHT71 comprenant un fragment d'ADN HindIII - PstI constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29 cloné dans un vecteur pUC9 préalablement hydrolysé avec les enzymes HindIII et PstI.
- 5 16. Souches bactériennes modifiées, caractérisées en ce qu'après transformation elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 13.
17. Souche bactérienne selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un vecteur recombinaut selon la revendication 14 ou 15.
- 10 18. Polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis répondant à la séquence (II) ou à la séquence (IV) d'acides aminés.
- 15 19. Polypeptide selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence (II) ou la séquence (IV) d'acides aminés définies dans la revendication 13.
- 20 20. Procédé d'obtention d'une séquence nucléotidique selon la revendication 1 codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé par les étapes suivantes :
  - la réalisation d'une hybridation entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis active contre S.littoralis et d'autre part, une ou plusieurs séquences de nucléotides utilisées comme sondes provenant de la partie 5' d'une part et de la partie 3' d'autre part, d'un fragment de restriction d'un gène d'une  $\delta$ -endotoxine de B.thuringiensis souche aizawai 7-29, ces parties 5' et 3' codant respectivement pour la partie N-terminale et pour la partie COOH-terminale d'un polypeptide de 130 kd toxique vis-à-vis des lépidoptères et en particulier actif contre P.brassicae et inactif contre S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinaut pHTA2 tel que représenté sur la figure 2
  - l'isolement du fragment.
  - son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.
- 25 21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le fragment recombinaut au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'au moins une séquence de nucléotides issue d'au moins un vecteur recombinaut contenant une séquence de nucléotides d'au moins une souche de B.thuringiensis.
- 30 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le fragment recombinaut au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins 2 souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis.
- 35 23. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que le fragment recombinaut au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII - PstI provenant de la souche aizawai 7-29.
- 40 24. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le fragment recombinaut au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII - HincII provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment de restriction HincII - PstI provenant de la souche aizawai 7-29.
- 45 25. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que le fragment de restriction recombinaut selon la revendication 23 est porté par un plasmide pHTA6 tel que représenté sur la figure 1 et les fragments de restriction recombinés selon la revendication 24, HindIII - HincII et HincII - PstI sont portés par les

5 plasmides recombinants respectifs pHTE6 et pHTA6, lesdits plasmides pHTA6 et pHTE6 tel que représenté sur la figure 1 étant tels qu'isolés à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotidiques issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

26. Composition larvicide à activité préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace de polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 18 et 19 exprimé par les séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 13, le vecteur selon la revendication 14, ou le plasmide selon la revendication 15, ou la souche bactérienne selon l'une quelconque des revendications 16 ou 17.

27. Application des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 pour produire un polypeptide toxique vis-à-vis de lépidoptères, de préférence S.littoralis, dans des microorganismes capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences tels que E.coli, B.subtilis, B.cereus ou B.thuringiensis.

28. Application selon la revendication 27, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes, tels que Pseudomonas, Azospirillum ou Rhizobium et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences.

29. Application selon la revendication 27 ou 28, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes en association avec différents gènes de  $\delta$ -endotoxine.

30. Application des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 à la transformation des plantes sensibles à S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend le transfert et l'expression de ces séquences dans ces plantes.

31. Cellules végétales dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 13 et, cellules issues de leur division.

32. Plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, transformées par un procédé non essentiellement biologique, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 13, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis et, plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication, ou de croisements hybrides.

33. Plante ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique répondant à la séquence d'acides aminés définie à la revendication 13, de manière préférentielle vis-à-vis S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans son génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

34. Graine capable de donner une plante selon la revendication 32 ou 33 ou issue d'une telle plante, caractérisée en ce qu'elle a intégré dans son génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

## 50 Claims

1. DNA sequence encoding at least a portion of the N-terminal region of a polypeptide specifically toxic against larvae of Lepidoptera of the Noctuidae family, characterized in that it contains a DNA fragment of about 3 kb corresponding to the HindIII - PstI restriction fragment derived from B. thuringiensis strain aizawai 7-29.

2. DNA sequence according to Claim 1, characterized in that the HindIII - PstI restriction fragment is capable of hybridizing with probes 1, 2, 3 of pHTA2 presented in Figure 2.

3. DNA sequence according to Claim 1 or 2, characterized in that it comprises sites in the following order:  
HindIII - HincII - BglII - KpnI - HindIII - PstI.
4. DNA sequence according to Claim 1, characterized in that it encodes a polypeptide capable of forming  
5 an immunological complex with antibodies to polypeptides with larvicidal activity against S. littoralis.
5. DNA sequence according to Claim 1, characterized in that it encodes a toxic polypeptide of S. littoralis.
6. DNA sequence encoding a polypeptide which is toxic against larvae of Lepidoptera of the Noctuidae  
10 family, characterized in that it comprises a DNA fragment corresponding to the HindIII - HincII  
restriction fragment of about 1.1 kb derived from B. thuringiensis strain entomocidus 6-01 fused with a  
HincII - PstI restriction fragment of about 1.9 kb derived from B. thuringiensis strain aizawai 729.
7. DNA sequence according to Claim 6, characterized in that it encodes a polypeptide capable of forming  
15 an immunological complex with antibodies to polypeptides with larvicidal activity against S. littoralis.
8. Nucleotide sequence characterized in that it is capable of hybridizing with a probe formed from the  
sequence (I) exhibiting the following configuration:

20

```

      52
    CTC TAC TTG ACA GCG GTA CGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT CCG GCA TAT ATT CAT
      112
    ATT TTA TAA AAT TTG TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA AGA TGT GTC ATA TGT ATT AAA
      172
    TCG TCG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT ACT TTA ATA AAA AAA CCG
    25      232

    ACG TAT TTT ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA ACT AAT
      292

    CCT GAA GAA GTA CTT TTG CAT GGA GAA GCG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT CAT ATT
    30      352

    TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GCG GCA GGA TTT TTA GTT
      412

    CGA TTA ATA GAT TTT GTA TCG GGA ATA GTT GCG CCT TCT CAA TCG GAT GCA TTT CTA GTA
      472
    35      532

    CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT CAA TTT GCT ACG AAT GCT GCT ATT GCT
      592

    AAT TTA GAA GGA TTA GGA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TCG CAA
      652
    40      712

    GAA CAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC ACG ACC AGA GTA ATT CAT CGC TTT CGT ATA CTT CAT
      772

    CGG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA
      832
    45      892

    TCC GTT TAT GCT CAA GCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA ATT TTT
      952

    CGA GAA AGA TCG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT ACG
      952

    CAT ATT GAT GAA TAT GCT CAT CAC TGT CCA AAT ACG TAT AAT CCG GCA TTA AAT AAT TTA
    50      952

    CCG AAA TCT ACG TAT CAA CAT TCG ATA ACA TAT AAT CCA TTA CCG AGA GAC TTA ACA TTC
      952

    ACT GTA TTA CAT ATC GCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC
  
```

55

or from the sequence (III) exhibiting the following configuration:



10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70  
 71  
 72  
 73  
 74  
 75  
 76  
 77  
 78  
 79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100

951  
 1081  
 1171  
 1261  
 1351  
 1441  
 1531  
 1621  
 171  
 1801

1544  
 CAT ATG CCG CTG CAG AAA AAT ATG GAG AAA TTA ACA TCT AAA ACA TTT AAA TAT ACC GAT TTT AGT AAA CCG TTT TCA TTT  
 1581  
 ACA CCG AAT CCA GAT ATA ATT GCG ATA AAT GAA CAA CCG CTA TTT GAT GCA GAT TCT ATT AGT ACC GCG GAA CTT TAT ATA GAT AAA ATT  
 2071  
 GAA ATT ATT CTA GCA GAT GCA ACA TTT GAA GCA TCT GAT TTA GAA AAA GCA CAA AAG GCG GAG AAT GCG TTT ACT TCT TCC AAT  
 2161  
 CAA ATC GCG TTA AAA ACC GAT GTG ACC GAT TAT CAT ATT GAT CAA GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA GAT GAA TTT TGT CAG GAT  
 2251  
 GAA AAG LAA GAA TTT TCC GAG AAA GTC AAA CAT GCG AAA CCA CTC AGT GAT GAG GCG AAT TTA CTT CAA GAT CCA AAG TTC AAG GCG ATC  
 2341  
 AAT ACA CAA CCA GAC CGT GCG TGG ACA GCA AGT ACA GAT ATT ACC ATC CAA GAA GCA GAT GAG GTA TTC AAA GAG AAT TAC GTC ACA CTA  
 2431  
 CCG GGT ACC GTT GAT GAG TGC TAT CCA ACC TAT TTA TAT CAG AAA ATA GAT GAG TCG AAA TTA AAA GCG TAT ACC CGT TAT GAA TTA AGA  
 2521  
 GAG TAT ATC GAA GAT AGT CAA GAG TTA GAA ATC TAT TTG ATC GCG TAC AAT GCA AAA CAG GAA ATA GAT GTG CCA GAG ACC GAT TCC  
 2611  
 TTA TGG CCG CTT TCA GCG CAA AGT CCA ATC GCA AAG TGT GGA GAA CCG AAT CAA TCG GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAT CCG GAT CTA GAT  
 2701  
 TCT TCC TGC AG

- 55 9. Nucleotide sequence encoding a polypeptide specifically toxic against larvae of Lepidoptera of the Noctuidae family, preferentially against S. littoralis, characterized in that it comprises the configuration (I) or (III) defined in Claim 8.

10. Nucleotide sequence according to Claim 8 or 9, characterized in that it has an ATG initiation codon situated at position 241.

5 11. Sequence according to any one of Claims 8 to 10, characterized by a ribosome binding site GGAGG at positions 230 to 234.

12. Sequence according to one of Claims 9 to 11, characterized in that it comprises the sequence between the nucleotides at position 137 and 177 (position -103 to -63 upstream of the ATG initiation codon) which is homologous in an amount of about at least 70 % to the region present upstream of the crystal gene of the kurstaki HD1 Dipel (BTK) strain which contains the three promoters Btl, BtII and Ec which are functional in B. thuringiensis and E. coli respectively.

13. Nucleotide sequence characterized in that it encodes a polypeptide comprising the following amino acid sequence (II):

15

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN

20 PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE

25

SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL

GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL

30

GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA

ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU

35

GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP

GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU

40

SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE

GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG

HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU

45

PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU

THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

50

or characterized in that it encodes a polypeptide comprising the following sequence (IV) of amino acids:

55

55

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

271  
 PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PEP GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER ILE ASP ILE SER LEU SER  
 281  
 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL IAP GLY ILE VAL GLY PRO SER  
 291  
 GLN IAP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU  
 301  
 GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU IAP GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE  
 311  
 ARG ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR  
 321  
 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG IAP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU  
 331  
 CYS TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER  
 341  
 THR TYR GLN ASP IAP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ASP LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

991

ASH ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASH PHE ARG PRO GLN LEU GLN SER  
 1001 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ARG VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ARG PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ARG ARG LEU THR ILE PHE  
 1171 THR ASP TRP PHE SER VAL GLY ARG ARG PHE TYR TRP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ARG ILE THR SER PRO  
 1261 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ARG GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ARG GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG  
 1331 LEU LEU GLN GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ARG LEU ARG GLY GLY VAL GLU PHE SER THR PRO THR ARG SER PHE THR TYR  
 1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ARG SER VAL PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS  
 1531 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL VAL PHE SER TRP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ARG  
 1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ARG GLN ILE PRO LEU VAL CYS GLY PHE ARG VAL TRP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE  
 1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ARG THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ARG ILE ARG SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG  
 1801 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

1111 PRO LEU GLN LYS THR PHE GLU ILE GLY GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE THR ASP PHE SER ASN PRO PHE SER PHE  
 1261 ARG ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE  
 1371 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA VAL LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN  
 1461 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP THR MIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP  
 1551 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS MIS ALA LYS ARG LEU SER ASP GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE  
 1641 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU  
 1731 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG  
 1821 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER  
 1911 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP  
 2001 CYS SER CYS

- 55 14. Recombinant expression and cloning vector containing at least part of the nucleotide sequence as defined in any one of Claims 1 to 13.

15. Plasmid according to Claim 14, characterized in that it is pHT671 as represented in Figure 4, or pHT71 comprising a HindIII - PstI DNA fragment consisting solely of DNA derived from the aizawai 7-29 strain, cloned into a vector pUC9 previously hydrolysed with the enzymes HindIII and PstI.
- 5 16. Modified bacterial strains, characterized in that after transformation, they contain a nucleotide sequence according to one of Claims 1 to 13.
17. Bacterial strain according to Claim 16, characterized in that it contains at least one recombinant vector according to Claim 14 or 15.
- 10 18. Polypeptide toxic against the larvae of Lepidoptera and preferentially against S. littoralis, characterized in that it is capable of forming an immunological complex with antibodies to polypeptides with larvicidal activity against S. littoralis corresponding to the amino acid sequence (II) or (IV).
- 15 19. Polypeptide according to Claim 18, characterized in that it comprises the amino acid sequence (II) or (IV) defined in Claim 13.
- 20 20. Process for the production of a nucleotide sequence according to Claim 1 encoding at least part of the N-terminal region of a polypeptide specifically toxic against larvae of Lepidoptera of the Noctuidae family, preferentially against S. littoralis, characterized by the following steps:
  - performing a hybridization between, on the one hand, a nucleotide sequence from a B. thuringiensis strain active against S. littoralis and, on the other hand, one or more nucleotide sequences, used as probes, derived, on the one hand, from the 5' part and, on the other hand, from the 3' part of a restriction fragment of a B. thuringiensis strain aizawai 7-29  $\delta$ -endotoxin gene, these 5' and 3' parts respectively encoding the NH<sub>2</sub>-terminal part and the COOH-terminal part of a 130 kd polypeptide toxic against Lepidoptera, and in particular active against P. brassicae and inactive against S. littoralis, this gene having been cloned into the recombinant plasmid pHTA2, as represented in Figure 2,
  - isolating the fragment,
  - 30 - its cloning into a vector, followed by its purification.
21. Process according to Claim 20, characterized in that the fragment recombined with the vector in the cloning step is prepared from at least one nucleotide sequence obtained from at least one recombinant vector containing a nucleotide sequence from at least one strain of B. thuringiensis.
- 35 22. Process according to Claim 21, characterized in that the fragment recombined with the vector in the cloning step is prepared from several nucleotide sequences obtained from recombinant vectors containing nucleotide sequences from at least 2 different strains of B. thuringiensis, possessing the same restriction maps and containing themselves all or part of the nucleotide sequences capable of encoding a polypeptide active preferentially against S. littoralis.
- 40 23. Process according to Claim 21, characterized in that the fragment recombined with the vector in the cloning step is prepared from a HindIII - PstI restriction fragment derived from the aizawai 7-29 strain.
- 45 24. Process according to Claim 22, characterized in that the fragment recombined with the vector in the cloning step is prepared from a HindIII - HincII restriction fragment derived from the entomocidus 6-01 strain and from a HincII - PstI restriction fragment derived from the aizawai 7-29 strain.
- 50 25. Process according to Claim 20, characterized in that the recombined restriction fragment according to Claim 23 is carried by a plasmid pHTA6 as represented in Figure 1 and the recombined restriction fragments according to Claim 24, HindIII - HincII and HincII - PstI, are carried by the respective recombinant plasmids pHTE6 and pHTA6, the said plasmids pHTA6 and pHTE6 as represented in Figure 1 being as isolated with the aid of a probe consisting of a 2kb PvuII fragment of the plasmid pBT15-88 corresponding to the inner portion of a chromosomal crystal gene from the berliner 1715 strain, from transformant clones containing nucleotide sequences obtained from strains of B. thuringiensis active against larvae of Lepidoptera, inter alia of S. littoralis.
- 55



26. Larvicidal composition active preferentially against S. littoralis, characterized in that it contains an effective quantity of polypeptide as defined in one of Claims 18 and 19 expressed by the nucleotide sequences according to one of Claims 1 to 13, the vector according to Claim 14, or the plasmid according to Claim 15 or the bacterial strain according to either one of Claims 16 and 17.
27. Application of the nucleotide sequences according to any one of Claims 1 to 13 for producing a polypeptide toxic against Lepidoptera, preferably S. littoralis, in microorganisms capable of expressing recombinant vectors containing these sequences such as E. coli, B. subtilis, B. cereus or B. thuringiensis.
28. Application according to Claim 27, characterized in that the nucleotide sequences are introduced into microorganisms living in the environment or in association with plants, such as Pseudomonas, Azospirillum or Rhizobium and capable of expressing recombinant vectors containing these sequences.
29. Application according to Claim 27 or 28, characterized in that the nucleotide sequences are introduced into microorganisms in association with different  $\delta$ -endotoxin genes.
30. Application of the nucleotide sequences according to any one of Claims 1 to 13 to the transformation of S. littoralis-sensitive plants, characterized in that it comprises the transfer and expression of these sequences in these plants.
31. Plant cells whose genome, after transformation by a non-essential biological process, stably possesses a nucleotide sequence capable of expressing a polypeptide toxic against S. littoralis, as defined in any one of Claims 1 to 13, and cells obtained from their division.
32. Plants having in particular as predator S. littoralis, which are transformed by a non-essentially biological process, whose genome stably possesses a nucleotide sequence as defined in any one of Claims 1 to 13, capable of expressing a polypeptide toxic against S. littoralis and, plants obtained from their reproduction, from their multiplication or from hybrid crossings.
33. Plant having in particular as predator S. littoralis, possessing in addition to their original genotypic and phenotypic characters the property of expressing a polypeptide corresponding to the amino acid sequence defined in Claim 13, toxic preferentially against S. littoralis, this property resulting from the insertion into its genome, by genetic engineering, of a nucleotide sequence capable of expressing the said polypeptide.
34. Seed capable of yielding a plant according to Claim 32 or 33 or obtained from such a plant, characterized in that it has, integrated into its genome, by genetic engineering, a nucleotide sequence according to any one of Claims 1 to 13.

#### Patentansprüche

1. DNA-Sequenz, die für mindestens einen Teil der N-terminalen Region eines Polypeptids kodiert, das in spezifischer Weise gegenüber Larven von Schmetterlingen der Familie der Nachtfalter toxisch ist, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein DNA-Fragment von ca. 3 kb enthält, das dem Restriktionsfragment HindIII-PstI entspricht, welches aus B. thuringiensis, Stamm aizawai 7-29, stammt.
2. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Restriktionsfragment HindIII-PstI dazu befähigt ist, mit den Sonden 1, 2 und 3 von pHTA2 zu hybridisieren, welche auf Fig. 2 dargestellt sind.
3. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie Stellen in der folgenden Reihenfolge enthält: HindIII - HincII - BglII - KpnI - HindIII - PstI.

4. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
sie für ein Polypeptid kodiert, das dazu befähigt ist, einen immunologischen Komplex mit Antikörpern  
zu bilden, die gegen Polypeptide mit larvizider Wirksamkeit gegenüber *S.littoralis* gerichtet sind.
5. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
sie für ein von *S. littoralis* toxisches Polypeptid kodiert.
- 10 6. DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid kodiert, das gegenüber Larven von Schmetterlingen der Familie  
der Nachtfalter toxisch ist,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
sie ein DNA-Fragment enthält, das dem Restriktionsfragment HindIII - HincII von ca. 1,1 kb entspricht,  
welches aus *B. thuringiensis*, Stamm entomocidus 601, stammt, welcher mit einem Restriktionsfrag-  
ment HincII-PstI von ca. 1,9 kb fusioniert ist, das wiederum aus *B. thuringiensis*, Stamm aizawai 7-29,  
15 stammt.
7. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 6,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
20 sie für ein Polypeptid kodiert, das dazu befähigt ist, einen immunologischen Komplex mit Antikörpern  
zu bilden, die gegen Polypeptide mit larvizider Wirksamkeit gegenüber *S. littoralis* gerichtet sind.
8. Sequenz von Nukleotiden,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
25 sie die Befähigung besitzt, mit einer Sonde zu hybridisieren, die aus der Sequenz (I) gebildet ist,  
welche die folgende Kette aufweist:

30

35

40

45

50

55

52  
 GTC TAC TTG ACA GCG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT GCG GCA TAT ATT GAT  
 112  
 ATT TTA TAA AAT TTC TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA ACA TGT GTC ATA TGT ATT AAA  
 172  
 TCG TCG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT ACT TTA ATA AAA AAA CCG  
 232  
 ACC TAT TTT ATG CAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TCG ATA CCT TAC AAT TGT TTA ACT AAT  
 292  
 CCT GAA GAA GTA CTT TTG GAT GGA GAA CCG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT  
 352  
 TCT CTC TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GCG GCA GCA TTT TTA GTT  
 412  
 CGA TTA ATA GAT TTT GTA TCG GCA ATA GTT CCG CCT TCT CAA TCG GAT GCA TTT CTA GTA  
 472  
 CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT CAA TTT GCT AGG AAT GCT GCT ATT GCT  
 532  
 AAT TTA GAA GCA TTA GCA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TCG GAA  
 592  
 GAA GAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CCG TTT CGT ATA CTT GAT  
 652  
 GCG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA  
 712  
 TCG GTT TAT GCT CAA CCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA ACA GAT TCT GTA ATT TTT  
 772  
 CGA GAA AGA TCG CGA TTC ACA ACC ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT ACC  
 832  
 CAT ATT GAT GAA TAT GCT CAT CAC TGT CCA AAT ACC TAT AAT CCG GCA TTA AAT AAT TTA  
 892  
 CCG AAA TCT ACC TAT CAA CAT TCG ATA ACA TAT AAT CGA TTA CCG AGA GAC TTA ACA TTC  
 952  
 ACT GTA TTA CAT ATC CCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC

35 oder welche Sonde aus der Sequenz (III) gebildet ist, die die folgende Kette aufweist:

40

45

50

55

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000

5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1541  
 1381  
 2071  
 2161  
 2231  
 2341  
 2431  
 2521  
 2611  
 2701  
 161 1CC 16C AC

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50

1541  
 1381  
 2071  
 2161  
 2231  
 2341  
 2431  
 2521  
 2611  
 2701  
 161 1CC 16C AC

9. Sequenz von Nukleotiden, die für ein Polypeptid kodiert, das in spezifischer Weise gegenüber Larven von Schmetterlingen der Familie der Nachtfalter, vorzugsweise gegenüber *S. littoralis*, toxisch ist, dadurch **gekennzeichnet**, daß sie die in Anspruch 8 definierte Kette (I) oder (III) enthält.

10. Sequenz von Nukleotiden gemäß Anspruch 8 oder 9,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
sie ein Initiationskodon ATG in Position 241 aufweist.
- 5 11. Sequenz gemäß jedem der Ansprüche 8 bis 10,  
**gekennzeichnet** durch  
eine Bindungsstelle an Ribosomen GGAGG in Positionen 230 bis 234.
12. Sequenz gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11,  
10 dadurch **gekennzeichnet**, daß  
sie die Sequenz von Nukleotiden von Position 137 bis 177 (Position -103 bis -63 von oberhalb des  
Initiationskodons ATG) enthält, welche bezüglich ungefähr mindestens 70% der Region homolog ist,  
die oberhalb des Kristallgens des Stammes kurstaki-HD1 Dipel (BTK) vorliegt und die drei Promotoren  
Btl, BtlI und Ec enthält, die in *B. thuringiensis* bzw. *E. coli* funktionell sind.
- 15 13. Sequenz von Nukleotiden,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
sie für ein Polypeptid kodiert, das die Sequenz (II) der folgenden Aminosäuren enthält:

20 MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASI  
PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE  
25 SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL  
CLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL  
GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA  
30 ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU  
GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP  
35 GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU  
SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE  
40 GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG  
HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU  
45 PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU  
THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

- 50 oder dadurch **gekennzeichnet**, daß sie für ein Polypeptid kodiert, das die Sequenz (IV) der folgenden  
Aminosäuren enthält:

55

MET GLU GLU ASN ASN GLN GLN CYS ILE



5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

221

05M ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER  
 1001 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE  
 1171 THR ASP TAP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TRP GLY GLY MET HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY GLY ASN ILE THR SER PRO  
 1201 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG  
 1331 LEU LEU GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU VAL GLY PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR ILE  
 1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS  
 1531 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL PHE SER THR THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN  
 1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TAP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE  
 1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG THR ARG  
 1801 LEU ARG PHE ARG THR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

11M PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR IAH ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE  
 1901 PHE ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE  
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN  
 2101 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP  
 2231 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE  
 2341 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY THR ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU  
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG  
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER  
 2611 LEU THR PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU THR ASN PRO ASP LEU ASP  
 2701 CYS SER CYS

55 14. Rekombinanter Expressions- und Klonierungsvektor, enthaltend mindestens einen Teil der in jedem der  
 Ansprüche 1 bis 13 definierten Nukleotidsequenz.

15. Plasmid gemäß Anspruch 14,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
es sich um pHT671, wie dargestellt auf Figur 4, oder um pHT71 handelt, enthaltend ein DNA-Fragment  
HindIII-PstI aus einziglich DNA, die aus dem Stamm aizawai 7-29 stammt, der in einem Vektor pUC9  
5 kloniert ist, welcher vorab mit den Enzymen HindIII und PstI hydrolysiert ist.
16. Modifizierte Bakterienstämme,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
sie nach Transformation eine Sequenz von Nukleotiden gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13  
10 enthalten.
17. Bakterienstamm gemäß Anspruch 16,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
er mindestens einen rekombinanten Vektor gemäß Anspruch 14 oder 15 enthält.  
15
18. Polypeptid, das gegenüber Schmetterlingslarven und bevorzugt gegenüber *S. littoralis* toxisch ist,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
es dazu befähigt ist, einen immunologischen Komplex mit Antikörpern zu bilden, die gegen Polypeptide  
der Sequenz (II) oder der Sequenz (IV) von Aminosäuren mit larvizider Wirksamkeit gegenüber *S.*  
20 *littoralis* gerichtet sind.
19. Polypeptid gemäß Anspruch 18,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
es die Sequenz (II) oder die Sequenz (IV) der in Anspruch 13 definierten Aminosäuren enthält.  
25
20. Verfahren zum Erhalt einer nukleotidischen Sequenz gemäß Anspruch 1, welche für mindestens einen  
Teil der N-terminalen Region eines Polypeptids kodiert, das in spezifischer Weise gegenüber Larven  
von Schmetterlingen der Familie der Nachtfalter, vorzugsweise gegenüber *S. littoralis*, toxisch ist,  
welches durch die folgenden Stufen gekennzeichnet ist:  
30 - man führt eine Hybridisierung zwischen einerseits einer Sequenz von Nukleotiden eines gegen *S.*  
*littoralis* aktiven Stammes von *B. thuringiensis* und andererseits einem oder mehreren Sequenzen  
von Nukleotiden durch, welche als Sonden eingesetzt sind, welche aus dem Teil 5' einerseits und  
dem Teil 3' andererseits eines Restriktionsfragments eines Gens eines  $\delta$ -Endotoxins von *B.*  
*thuringiensis*, Stamm aizawai 7-29, stammen, wobei diese Teile 5' und 3' jeweils für den N-  
35 terminalen Teil und für den COOH-terminalen Teil eines Polypeptids von 130 kd kodieren, das  
gegenüber Schmetterlingen toxisch und insbesondere gegen *P. brassicae* wirksam und gegen *S.*  
*littoralis* unwirksam ist, wobei dieses Gen im in Fig. 2 dargestellten rekombinanten Plasmid  
pHTA2 kloniert worden ist,  
- man isoliert das Fragment und  
40 - kloniert es in einen Vektor, worauf seine Reinigung erfolgt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
das in der Klonierungsstufe an den Vektor rekombinierte Fragment aus mindestens einer Sequenz von  
45 Nukleotiden elaboriert ist, die aus mindestens einem rekombinanten Vektor hervorgegangen ist, der  
eine Nukleotidsequenz mindestens eines Stammes von *B. thuringiensis* enthält.
22. Verfahren gemäß Anspruch 21,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
50 das in der Klonierungsstufe mit dem Vektor rekombinierte Fragment aus mehreren Nukleotidsequenzen  
elaboriert ist, die aus rekombinanten Vektoren hervorgegangen sind, die Nukleotidsequenzen von  
mindestens 2 von *B. thuringiensis* verschiedenen Stämmen enthalten, welche dieselben Restriktionskar-  
ten besitzen und ihrerseits eine ganze oder einen Teil der Nukleotidsequenzen enthalten, die dazu  
befähigt sind, für ein Polypeptid zu kodieren, das vorzugsweise gegenüber *S. littoralis* aktiv ist.  
55
23. Verfahren gemäß Anspruch 21,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
das in der Klonierungsstufe mit dem Vektor rekombinierte Fragment aus einem Restriktionsfragment

HinIII-PstI elaboriert ist, welches aus dem Stamm aizawai 7-29 hervorgeht.

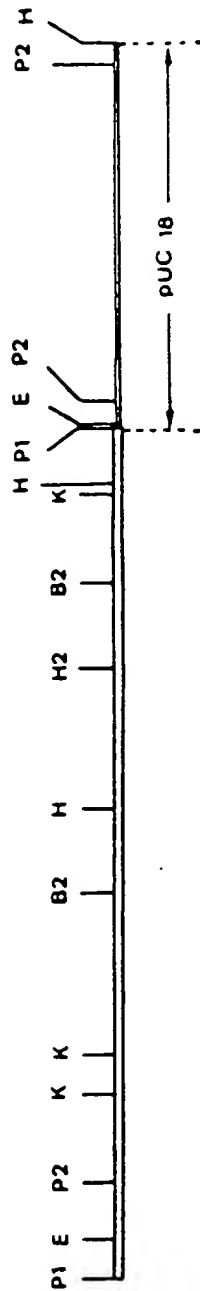
24. Verfahren gemäß Anspruch 22,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
5 das in der Klonierungsstufe an den Vektor rekombinierte Fragment aus einem Restriktionsfragment HindIII-HincII elaboriert ist, das aus dem Stamm entomocidus 601 und aus einem Restriktionsfragment HincII - PstI stammt, welches aus dem Stamm aizawai 7-29 hervorgeht.
25. Verfahren gemäß Anspruch 20,  
10 dadurch **gekennzeichnet**, daß  
das gemäß Anspruch 23 rekombinierte Restriktionsfragment von einem in Fig. 1 dargestellten Plasmid pHTA6 und die gemäß Anspruch 24 rekombinierten Restriktionsfragmente HindIII-HincII und HincII-PstI von den rekombinanten Plasmiden pHTA6 bzw. pHTA6 gehalten sind, wobei die in Fig. 1 dargestellten  
15 genannten Plasmide pHTA6 und pHTA6 so vorliegen, wie sie mittels einer Sonde aus einem Fragment PvuII von 2 kb des Plasmids pBT15-88 isoliert sind, das dem inneren Teil eines chromosomischen Kristallgens des Stammes berliner 1715 entspricht, ausgehend von transformanten Klonen, die nukleotidische Sequenzen einschließen, welche aus Stämmen *B. thuringiensis* hervorgegangen sind, die gegenüber Larven von Schmetterlingen u.a. von *S. littoralis* wirksam sind.
- 20 26. Larvizide Zusammensetzung mit einer Wirksamkeit vorzugsweise gegenüber *S. littoralis*,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
sie eine wirksame Menge von in jedem der Ansprüche 18 und 19 definierten Polypeptid enthält, das durch die nukleotidischen Sequenzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, durch den Vektor gemäß  
25 Anspruch 14 oder das Plasmid gemäß Anspruch 15 oder den bakteriellen Stamm gemäß jedem der Ansprüche 16 oder 17 exprimiert ist.
27. Anwendung der Sequenzen von Nukleotiden gemäß einem jeden der Ansprüche 1 bis 13 zur Erzeugung eines Polypeptids, das gegenüber Schmetterlingen, vorzugsweise *S. littoralis*, toxisch ist, in Mikroorganismen, die dazu befähigt sind, rekombinante Vektoren zu exprimieren, welche diejenigen  
30 Sequenzen wie *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* oder *B. thuringiensis* aufweisen.
28. Anwendung gemäß Anspruch 27,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
35 die Sequenzen von Nukleotiden in Mikroorganismen eingebracht sind, die im Umfeld oder zusammen mit Pflanzen, wie *Pseudomonas*, *Azospirillum* oder *Rhizobium*, leben und dazu befähigt sind, diese Sequenzen aufweisende rekombinante Vektoren zu exprimieren.
29. Anwendung gemäß Anspruch 27 oder 28,  
dadurch **gekennzeichnet**, daß  
40 die Sequenzen von Nukleotiden in Mikroorganismen zusammen mit verschiedenen Genen von  $\delta$ -Endotoxin eingebracht sind.
30. Anwendung von Sequenzen von Nukleotiden gemäß einem jeden der Ansprüche 1 bis 13 zur Transformation von gegenüber *S. littoralis* empfindlichen Pflanzen,  
45 dadurch **gekennzeichnet**, daß  
sie den Transfer und die Expression dieser Sequenzen in diesen Pflanzen umfaßt.
31. Pflanzliche Zellen, deren Genom, nach Transformation durch ein nicht-wesentlich biologisches Verfahren, in stabiler Form eine Sequenz von Nukleotiden besitzt, die dazu befähigt ist, ein gegenüber *S. littoralis* toxisches, in jedem der Ansprüche 1 bis 13 definiertes Polypeptid zu exprimieren, sowie aus  
50 deren Teilung hervorgegangene Zellen.
32. Pflanzen, die *S. littoralis* insbesondere zum Räuber haben, welche durch ein nicht-wesentlich biologisches Verfahren transformiert sind, deren Genom in stabiler Form eine in einem jeden der Ansprüche 1  
55 bis 13 definierte Sequenz von Nukleotiden besitzt, welche dazu befähigt ist, ein gegenüber *S. littoralis* toxisches Polypeptid zu exprimieren, sowie Pflanzen, die aus deren Reproduktion, Vervielfältigung oder Kreuzungshybriden hervorgegangen sind.

33. Pflanze, die *S. littoralis* insbesondere zum Räuber hat, welche zusätzlich zu ihren genotypischen und phänotypischen Anfangsmerkmalen die Eigenschaft besitzt, ein bevorzugt gegenüber *S. littoralis* toxisches Polypeptid gemäß der in Anspruch 13 definierten Sequenz von Aminosäuren zu exprimieren, wobei diese Eigenschaft aus der in ihr Genom durch genetische Manipulation vorgenommenen Insertion einer zur Expressierung des genannten Polypeptids befähigten Sequenz von Nukleotiden resultiert.

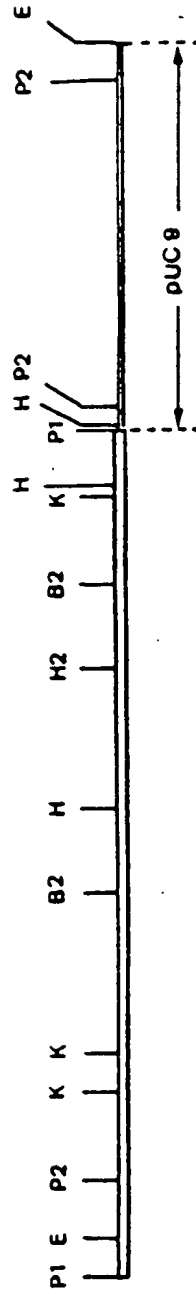
34. Korn, das dazu befähigt ist, eine Pflanze gemäß Anspruch 32 oder 33 zu ergeben, oder welches aus einer solchen Pflanze hervorgegangen ist, dadurch **gekennzeichnet**, daß es in seinem Genom durch genetische Manipulation eine Sequenz von Nukleotiden gemäß einem jeden der Ansprüche 1 bis 13 integriert enthält.

FIGURE 1

pHTA 6



pHTE 6



B2 : Bgl II  
 E : Eco RI  
 H2 : Hinc II  
 H : Hind III  
 K : Kpn I  
 P1 : Pst I  
 P2 : Pvu II

1Kb

FIGURE 2

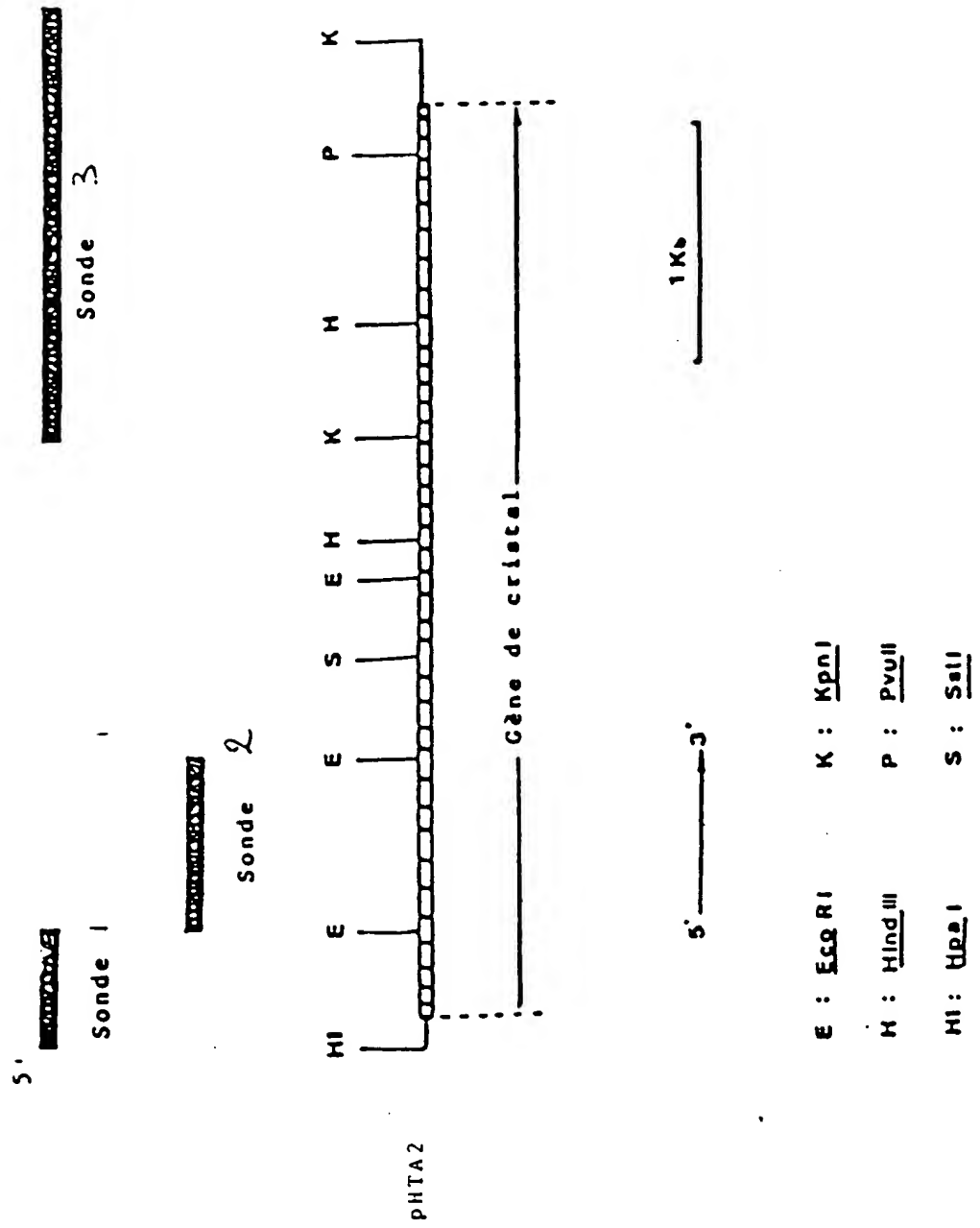


FIGURE 3



H: Hind III

P: Pst I

K: Kpn I

H2: Hinc II

Sonde 3

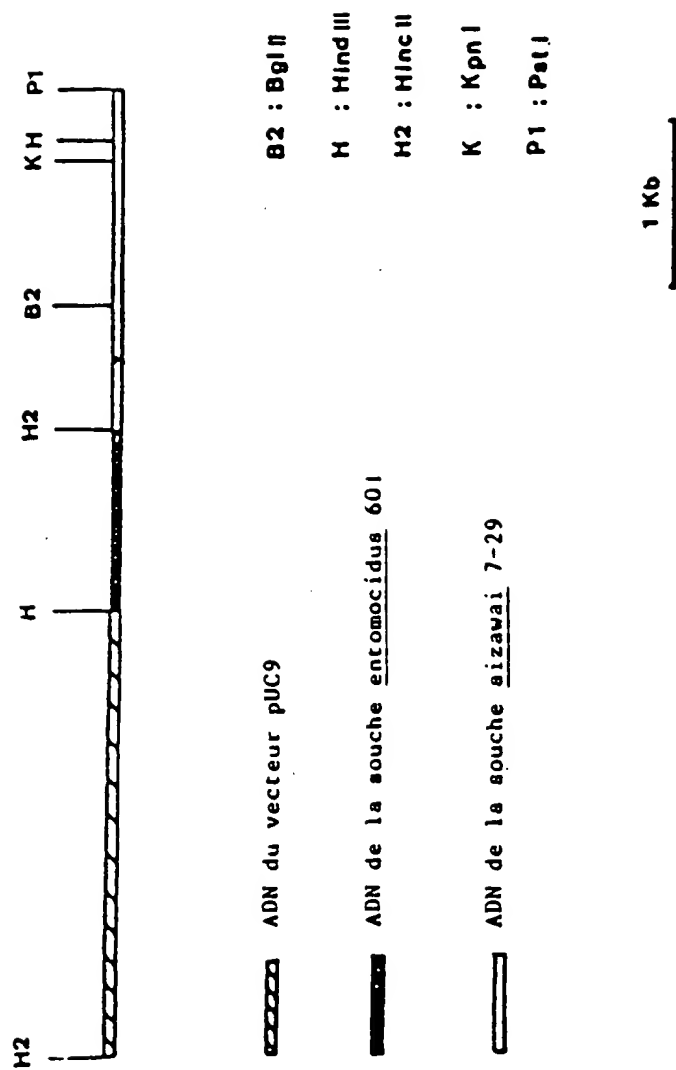
Sonde 2

Sonde 1



FIGURE 4

PHT 671



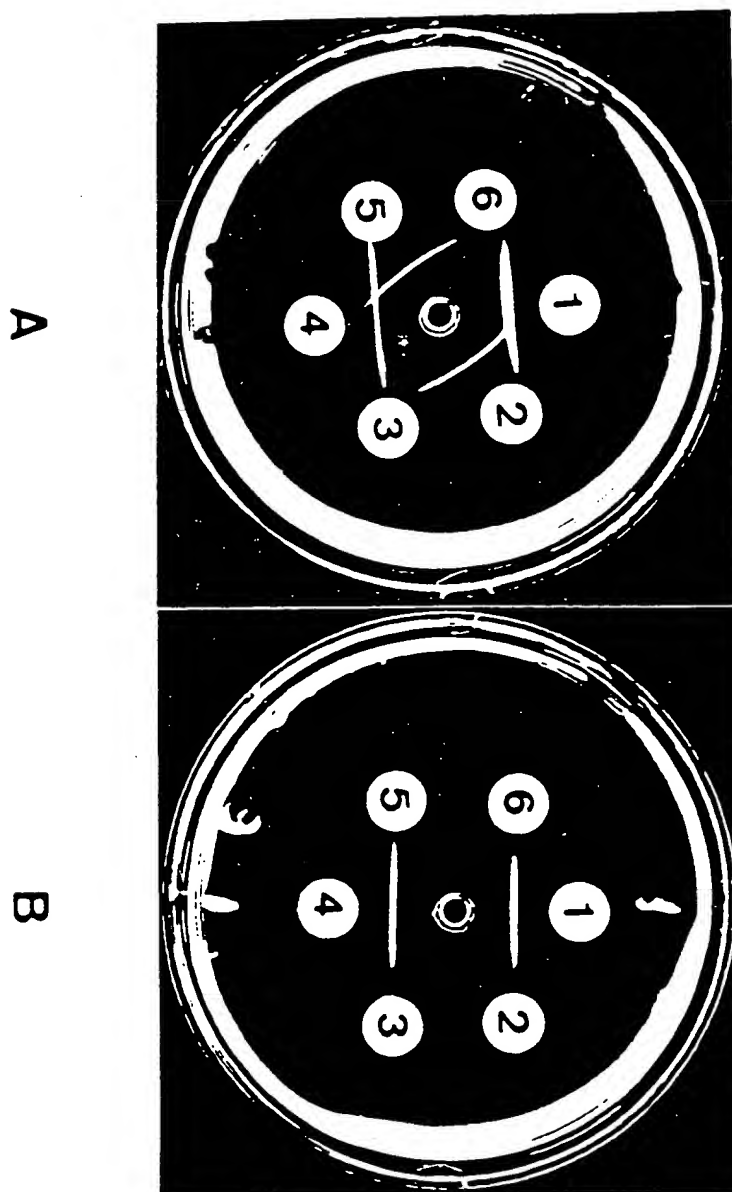


FIGURE 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of  
the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLATED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER :** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents *will not* correct the image  
problems checked, please do not report these problems to the  
IFW Image Problem Mailbox.**